

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-507540

(43) 公表日 平成11年(1999) 7月6日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 48/00		A 6 1 K 48/00	
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21	
5/10		5/00	B
// (C 1 2 N 1/21			
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 93 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平9-502261	(71) 出願人	ケース ウェスタン リザーブ ユニバーシティ
(86) (22) 出願日	平成8年(1996) 6月7日		アメリカ合衆国 オハイオ 44106-7015,
(85) 翻訳文提出日	平成9年(1997) 12月1日		クリーブランド, ユークリッド アベニュー 10900
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 6 / 1 0 2 4 8	(72) 発明者	バン ボックレン, ギル ビー,
(87) 国際公開番号	W O 9 6 / 4 0 9 6 5		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94022,
(87) 国際公開日	平成8年(1996) 12月19日		ロスアルトス, メルセデス アベニュー
(31) 優先権主張番号	0 8 / 4 8 7, 9 8 9		ナンバー28 1070
(32) 優先日	1995年6月7日	(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
(31) 優先権主張番号	0 8 / 6 4 3, 5 5 4		
(32) 優先日	1996年5月6日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 合成哺乳動物染色体および構築のための方法

(57) 【要約】

本発明は、遺伝子治療、遺伝子発現、およびそれらの使用のためのベクターの分野に関する。具体的には、本発明は、構造的にインタクトな大きな反復単位のDNAであって、特に、アルファサテライトDNAの安定なクローニングに有用なDNAを作製するための方法、および哺乳動物、特にヒトにおける遺伝子発現および遺伝子治療のための合成または人工染色体の開発および使用に関する。本発明は、精製されたDNAの単離セグメントから構築される安定な合成または人工染色体の制御された構築を可能にする。機能的に最小のセグメントは、好ましくは、セントロメアDNA、テロメアDNA、およびゲノムDNAを包含する。この染色体を遺伝子治療のための効果的なベクターとして機能させるために、人工染色体は天然に存在する染色体の必須染色体機能を担う。

【特許請求の範囲】

1. セントロメア、テロメアおよびゲノムDNAを本質的に含む人工哺乳動物類染色体。
2. 前記ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントである、セントロメアDNA、テロメアDNA、およびゲノムDNAを本質的に含む人工哺乳動物染色体。
3. 前記ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントであり、前記セントロメアDNAが有糸分裂の間にCENP-Eと会合するDNA配列を含み、そして前記テロメアDNAが配列TTAGGGのタンデム反復を含む、セントロメアDNA、テロメアDNA、およびゲノムDNAを本質的に含む人工哺乳動物染色体。
4. 精製されたDNAを用いて哺乳動物細胞をトランスフェクトするプロセスにより生産される人工哺乳動物染色体であって、該DNAがテロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAを本質的に含み、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントである、人工哺乳動物染色体。
5. 精製されたDNAを用いて哺乳動物細胞をトランスフェクトするプロセスにより生産される人工哺乳動物染色体であって、該DNAがテロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAを本質的に含み、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントであり、該セントロメアDNAが有糸分裂の間にCENP-Eと会合するDNA配列を含み、そして該テロメアDNAが配列TTAGGGのタンデム反復を含む、人工哺乳動物染色体。
6. 精製された裸のDNAを用いて哺乳動物細胞をトランスフェクトするプロセスにより生産される人工哺乳動物染色体であって、該DNAがテロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAを本質的に含み、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントである、人工哺乳動物染色体。

7. 精製された裸のDNAを用いて哺乳動物細胞をトランスフェクトするプロセスにより生産される人工哺乳動物染色体であって、該DNAがテロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAを本質的に含み、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントであり、該セントロメアDNAが有糸分裂の間にCENP-Eと会合するDNA配列を含み、そして該テロメアDNAが配列TTAGGGのタンデム反復を含む、人工哺乳動物染色体。

8. 精製された凝縮DNAを用いて哺乳動物細胞をトランスフェクトするプロセスにより生産される人工哺乳動物染色体であって、該DNAがテロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAを本質的に含み、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントである、人工哺乳動物染色体。

9. 精製された凝縮DNAを用いて哺乳動物細胞をトランスフェクトするプロセスにより生産される人工哺乳動物染色体であって、該DNAがテロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAを本質的に含み、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントであり、該セントロメアDNAが有糸分裂の間にCENP-Eと会合するDNA配列を含み、そして該テロメアDNAが配列TTAGGGのタンデム反復を含む、人工哺乳動物染色体。

10. 精製されたコートDNAを哺乳動物細胞中にトランスフェクトするプロセス

により生産される人工哺乳動物染色体であって、該DNAがセントロメアDNA、テロメアDNA、およびゲノムDNAを本質的に含み、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントである、人工哺乳動物染色体。

11. 精製されたコートDNAを哺乳動物細胞中にトランスフェクトするプロセスにより生産される人工哺乳動物染色体であって、該DNAがテロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAを本質的に含み、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択される

サブゲノムDNAフラグメントであり、該セントロメアDNAが有糸分裂の間にCENP-Eと会合するDNA配列を含み、そして該テロメアDNAが配列TTAGGGのタンデム反復を含む、人工哺乳動物染色体。

12. 前記セントロメアDNA、前記テロメアDNA、および前記ゲノムDNAが互いに連結されていない、請求項4～11のいずれかに記載の人工哺乳動物染色体。

13. 1つ以上の前記セントロメアDNA、前記テロメアDNA、および前記ゲノムDNAが別の1つと連結されている、請求項4～11のいずれかの人工哺乳動物染色体。

14. 請求項1～11のいずれかに記載の人工哺乳動物染色体を含む組成物。

15. 前記セントロメアDNAがアルファサテライトDNAを含む、請求項1～11のいずれかに記載の人工哺乳動物染色体。

16. 請求項1～11のいずれかに記載の人工哺乳動物染色体を含む哺乳動物細胞。

17. 前記染色体がさらに、該染色体が哺乳動物細胞に導入された場合に、該染

色体から発現されるか、または遺伝子産物の発現を引き起こす異種DNAを含む、請求項1～11のいずれかに記載の人工哺乳動物染色体。

18. テロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAを本質的に含む精製されたDNAであって、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントである、精製されたDNA。

19. テロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAを本質的に含む精製されたDNAであって、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントであり、該セントロメアDNAが有糸分裂の間にCENP-Eと会合するDNA配列を含み、そして該テロメアDNAが配列TTAGGGのタンデム反復を含む、精製されたDNA。

20. テロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAを本質的に含む精製された裸のDNAであって、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグ

メントである、精製された裸のDNA。

2 1. テロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAを本質的に含む精製された裸のDNAであって、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントであり、該セントロメアDNAが有糸分裂の間にCENP-Eと会合するDNA配列を含み、そして該テロメアDNAが配列TTAGGGのタンデム反復を含む、精製された裸のDNA。

2 2. テロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAを本質的に含む精製された凝縮DNAであって、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグ

メントであり、ここで、該DNAがDNA凝縮剤でコートされている、精製された凝縮DNA。

2 3. テロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAを本質的に含む精製された凝縮DNAであって、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントであり、該セントロメアDNAが有糸分裂の間にCENP-Eと会合するDNA配列を含み、そして該テロメアDNAが配列TTAGGGのタンデム反復を含み、ここで、該DNAがDNA凝縮剤で結合されている、精製された凝縮DNA。

2 4. テロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAを本質的に含む精製されたコートDNAであって、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントであり、ここで、該DNAが1つ以上のDNA結合タンパク質でコートされている、精製されたコートDNA。

2 5. テロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAを本質的に含む精製されたコートDNAであって、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントであり、該セントロメアDNAが有糸分裂の間にCENP-Eと会合するDNA配列を含み、そして該テロメアDNAが配列TTAGGGのタンデム反復を含み、ここで、該D

NAが1つ以上のDNA結合タンパク質で結合されている、精製されたコートDNA。

26. テロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAをインビトロで組み合わせるプロセスにより作製される精製されたDNAであって、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントである、精製されたDNA。

27. テロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAをインビトロで組み合

わせるプロセスにより作製される精製されたDNAであって、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントであり、該セントロメアDNAが有糸分裂の間にCENP-Eと会合するDNA配列を含み、そして該テロメアDNAが配列TTAGGGのタンデム反復を含む、精製されたDNA。

28. テロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAをインビトロで組み合わせるプロセスにより作製される精製された裸のDNAであって、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントである、精製された裸のDNA。

29. テロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAをインビトロで組み合わせるプロセスにより作製される精製された裸のDNAであって、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントであり、該セントロメアDNAが有糸分裂の間にCENP-Eと会合するDNA配列を含み、そして該テロメアDNAが配列TTAGGGのタンデム反復を含む、精製された裸のDNA。

30. テロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAをインビトロで組み合わせるプロセスにより作製される精製された凝縮DNAであって、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントであり、ここで、該DNAがDNA凝縮剤で結合されている、精製された凝縮DNA。

31. テロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAをインビトロで組み合わせるプロセスにより作製される精製された凝縮DNAであって、ここで、該ゲノ

ムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントであり、該セントロメアDNAが有糸分裂の間にCENP-Eと会合するDNA配列を含み、そして該テロメアDNAが配列TTAG

GGのタンデム反復を含み、ここで、該DNAがDNA凝縮剤で結合されている、精製された凝縮DNA。

32. テロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAをインビトロで組み合わせるプロセスにより作製される精製されたコートDNAであって、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントであり、ここで、該DNAが1つ以上のDNA結合タンパク質でコートされている、精製されたコートDNA。

33. テロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAをインビトロで組み合わせるプロセスにより作製される精製されたコートDNAであって、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントであり、該セントロメアDNAが有糸分裂の間にCENP-Eと会合するDNA配列を含み、そして該テロメアDNAが配列TTAGGGのタンデム反復を含み、ここで、該DNAが1つ以上のDNA結合タンパク質でコートされている、精製されたコートDNA。

34. 請求項18～33のいずれかに記載のDNAを含む組成物。

35. 請求項18～33のいずれかに記載の精製されたDNAを含む哺乳動物細胞

。

36. 前記セントロメアDNA、前記テロメアDNA、および前記ゲノムDNAが互いに連結されていない、請求項18～33のいずれかに記載の精製されたDNA。

37. 1つ以上の前記セントロメアDNA、前記テロメアDNAおよび前記ゲノムDNAが互いに連結されている、請求項18～33のいずれかに記載の精製されたDNA

。

38. 前記セントロメアDNAがアルファサテライトDNAを含む、請求項18～33のいずれかに記載の精製されたDNA。

39. 前記DNAがさらに、該DNAが哺乳動物細胞に導入された場合に、該染色体から発現されるか、または遺伝子産物の発現を引き起こす異種DNAを含む、請求項18～33のいずれかに記載の精製されたDNA。
40. 請求項18～33のいずれかに記載のDNAを含むベクター。
41. 請求項40のベクターを含む細胞。
42. 請求項40のベクターを含む組成物。
43. 反復タンデム配列のDNAをクローニングする方法であって、該方法が以下の工程：
- (a) 第1のDNA単位を、該DNA単位の反対の末端が相補的ではあるが非アイソシマー制限部位を含むように調製する工程；
  - (b) 該DNA単位をベクターに連結する工程；
  - (c) 該ベクターを該制限部位の1つで直鎖状化する工程；
  - (d) 工程(a)と同様に調製した第2のDNA単位を、該第1の単位とタンデムに連結して、指向的反復配列を形成する工程；
  - (e) 該配列を細菌宿主細胞に形質転換する工程；
  - (f) 該配列を含有する安定なクローンを選択する工程；および、
  - (g) 工程(c)～(f)を所望の配列サイズに達するまで繰り返す工程、
- を包含する、方法。
44. 前記DNAがアルファサテライトDNAである、請求項43に記載の方法。
45. 前記アルファサテライトDNAの前記配列が100kbを超える長さである、請求項44に記載の方法。

46. 前記アルファサテライトDNAの前記配列が140kbを超える長さである、請求項45に記載の方法。
47. 前記アルファサテライトDNAがヒトアルファサテライトDNAである、請求項44に記載の方法。
48. 指向的反復DNA配列からなる配列を含むベクターであって、該配列は反復DNA単位を含み、ここで、各DNA単位の両端が相補的ではあるが非アイソシマー制限部位を含有する、ベクター。



- 49. 前記DNAがアルファサテライトDNAである、請求項48に記載のベクター。
- 50. 前記アルファサテライトDNAの前記配列が100kbを超える長さである、請求項49に記載のベクター。
- 51. 前記アルファサテライトDNAの前記配列が140kbを超える長さである、請求項50に記載のベクター。
- 52. 前記アルファサテライトDNAがヒトアルファサテライトDNAである、請求項47に記載のベクター。
- 53. 請求項47～52のいずれかに記載のベクターで安定に形質転換された宿主細胞。
- 54. 前記宿主細胞が原核細胞である、請求項53に記載の宿主細胞。
- 55. 前記原核細胞がE. coliである、請求項54に記載の宿主細胞。
- 56. 人工哺乳動物染色体を作製する方法であって、該方法が請求項18～33

のいずれかに記載の精製されたDNAを哺乳動物細胞に導入する工程を包含する、方法。

57. 人工哺乳動物染色体を作製する方法であって、該方法が請求項34に記載の組成物Aを哺乳動物細胞に導入する工程を包含する、方法。

58. 精製されたDNA組成物を作製する方法であって、該方法が、精製されたテロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAをインビトロで組み合わせる工程を包含し、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントである、方法。

59. 精製されたDNA組成物を作製する方法であって、該方法が、精製されたテロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAをインビトロで組み合わせる工程を包含し、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントであり、該セントロメアDNAが有糸分裂の間にCENP-Eと会合するDNA配列を含み、そして該テロメアDNAが配列TTAGGGのタンデム反復を含む、方法。

60. 精製された裸のDNA組成物を作製する方法であって、該方法が、精製され

たテロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAをインビトロで組み合わせる工程を包含し、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントである、方法。

6 1. 精製された裸のDNA組成物を作製する方法であって、該方法が、精製されたテロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAをインビトロで組み合わせる工程を包含し、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメン

トであり、該セントロメアDNAが有糸分裂の間にCENP-Eと会合するDNA配列を含み、そして該テロメアDNAが配列TTAGGGのタンデム反復を含む、方法。

6 2. 精製された凝縮DNA組成物を作製する方法であって、該方法が、DNA凝縮剤と精製されたテロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAとをインビトロで組み合わせる工程を包含し、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントである、方法。

6 3. 精製された凝縮DNA組成物を作製する方法であって、該方法が、DNA凝縮剤と精製されたテロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAとをインビトロで組み合わせる工程を包含し、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントであり、該セントロメアDNAが有糸分裂の間にCENP-Eと会合するDNA配列を含み、そして該テロメアDNAが配列TTAGGGのタンデム反復を含む、方法。

6 4. 精製されたコートDNA組成物を作製する方法であって、該方法が、1つ以上のDNA結合タンパク質と精製されたテロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲノムDNAとをインビトロで組み合わせる工程を包含し、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントである、方法。

6 5. 精製されたコートDNA組成物を作製する方法であって、該方法が、1つ以上のDNA結合タンパク質と精製されたテロメアDNA、セントロメアDNA、およびゲ

ノムDNAとをインビトロで組み合わせる工程を包含し、ここで、該ゲノムDNAが制限酵素消化フラグメントおよび機械的に剪断したフラグメントからなる群より選択されるサブゲノムDNAフラグメントであり、該セントロメアDNAが有糸分裂の間にCENP-Eと会合するDNA配列を含み、そして該テロメアDNAが配列TTAGGGのタンデム反復を含む、方法。

66. 前記セントロメアDNA、前記テロメアDNA、および前記ゲノムDNAが互いに連結されていない、請求項56～65のいずれかに記載の方法。

67. 1つ以上の前記セントロメアDNA、前記テロメアDNA、および前記ゲノムDNAが互いに連結されている、請求項56～65のいずれかに記載の方法。

68. 哺乳動物細胞内で遺伝子を発現させる方法であって、該方法が請求項1～11のいずれかに記載の人工染色体を含有する哺乳動物細胞を増殖させる工程を包含し、ここで、該染色体が該遺伝子を含むかまたは該遺伝子を発現させるDNA配列を含む、方法。

69. 哺乳動物細胞内で異種遺伝子を発現させる方法であって、該方法が請求項18～33のいずれかに記載のDNAを含有する哺乳動物細胞を増殖させる工程を包含し、ここで、該DNAが該遺伝子を含むかまたは該遺伝子を発現させるDNA配列を含む、方法。

70. 前記遺伝子発現が前記細胞を含む哺乳動物に治療上の利益を与える、請求項68に記載の方法。

71. 前記遺伝子発現が前記細胞を含む哺乳動物に治療上の利益を与える、請求項69に記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 合成哺乳動物染色体および構築のための方法

連邦政府の援助による研究および開発の下でなされた発明に関する権利の宣言

本発明の開発の間になされた業績の一部は米国政府基金を利用した。米国政府は本発明において特定の権利を有する。

##### 発明の分野

本発明は、遺伝子発現および遺伝子治療の分野、ならびにそれらの使用のための新規ベクターに関する。具体的には、本発明は、特にヒトにおける遺伝子発現および遺伝子治療のためのベクターとしての合成または人工染色体の開発および使用に関する。本発明は、単離精製されたDNAからの安定な合成または人工染色体の制御された構築を可能とする。このDNAに関しては、機能的染色体が細胞で形成され、染色体外エレメントにおいて維持される。治療DNAが染色体に含まれる場合、この染色体を遺伝子治療のための効果的なベクターとして機能させるために、人工染色体は天然に存在する染色体の必須染色体機能を担う。

##### 発明の背景

遺伝したかまたは獲得した疾患を直すことを目的とする細胞の遺伝子操作を遺伝子治療という。今日まで、この分野におけるほとんどの臨床研究は、ウイルス遺伝子治療ベクターの使用に焦点を当ててきた。これらの研究の結果に基づいて、現行のウイルス遺伝子治療ベクターは厳しい臨床的制限を有することが明らかにされつつある。これらは、免疫原性、細胞変性性、無規則性の遺伝子発現、および治療遺伝子のサイズについての制限を含む。これらの理由で、近年、多くの注目が非ウイルス遺伝子治療ベクターの使用に向けられてきた。

特に、合成哺乳動物染色体は、生細胞に対する種々の遺伝子操作を容易にするために有用なベクターである。合成哺乳動物染色体の利点は、高い有糸分裂安定性、規則的かつ調節された遺伝子発現、高クローニング能力、および非免疫原性

を含む。

人工染色体は、最初に、1983年に*S. cerevisiae* (Murrayら, *Nature*, 305:189-193(1983))で、および1989年に*S. pombe* (Hahnenbergerら, *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 86:577-581(1989)) で構築された。しかし、多くの理由で、同様のベクターが哺乳動物細胞で作製され得るか否かは明らかではなかった。

第1に、多細胞生物（すなわち、哺乳動物細胞の祖先）は10億年以前に酵母から分岐した。生きている生物の間には類似性があるものの、一般に、2つの生物間の類似性は、逆に、それらの進化的分岐の程度に関連する。明らかに、酵母、単細胞生物は、複雑な単細胞脊椎動物と生物学的にかなり異なる。

第2に、酵母染色体は哺乳動物染色体よりも数オーダー大きさが小さい。S. cerevisiaeおよびS. pombeにおいては、染色体は、それぞれ、0.2~2メガベースおよび3.5~5.5メガベースの長さである。対照的に、哺乳動物染色体は、約50メガベース~250メガベースのサイズの範囲である。サイズにおいてかなりの差が存在するので、先験的には、酵母人工染色体に匹敵する構築体が構築し得、そして哺乳動物細胞にトランスフェクトされ得るか否かは明らかではない。

第3に、酵母染色体は、哺乳動物染色体よりも凝縮していない。これは、哺乳動物染色体が、このより高いレベルの構造を達成するために、より複雑なクロマチン相互作用に依存することを意味する。哺乳動物染色体の複雑な構造（DNA構造および高次元のクロマチン構造の両方）は、人工染色体が哺乳動物細胞において作製され得るか否かの疑問を投げかける。

第4に、酵母染色体は哺乳動物セントロメアよりも複雑性がかなり低い。S. cerevisiaeでは、例えば、セントロメアは125bp配列よりなる。S. pombeでは、セントロメアは14kb配列エレメントの約2~3コピー、およびコア領域によって分けられた逆方向反復（約7kb）から構成される。対照的に、ヒトセントロメアは高度に反復するアルファサテライトDNAの数100キロベース~数メガベースよりなる。さらに、哺乳動物セントロメアでは、S. pombeで見出されているような中央コア領域または逆方向反復の証拠は存在しない。従って、酵母セントロメアとは異なり、哺乳動物セントロメアは極度に大きく、そして反復性である。

第5に、酵母セントロメアは、哺乳動物セントロメアよりもはるかに少ない紡

錘体付着物しか有さない (Bloom, Cell 73:621-624(1993))。S. cerevisiaeは、例えば、セントロメアに付着した1つの微小管を有する。S. pombeでは、1つ

のセントロメアあたり2～4の微小管が付着したものが存在する。他方、ヒトでは、各染色体のセントロメアに付着した数ダースの微小管が存在する (Bloom, Cell, 73:621-624(1993))。これは、酵母セントロメアと比較して、哺乳動物セントロメアの複雑性をさらに示す。

まとめると、これらの差異は著しく、そして酵母での結果が哺乳動物に当てはめられ得ることを合理的に予測され得ることを示唆しない。

正常な哺乳動物染色体は、約50～240メガベースのサイズ範囲の連続する直鎖状DNAからなる。これらの遺伝的単位が各細胞分裂において信頼性高く複製され、そして分離されるためには、それらは少なくとも3つのタイプの機能的エレメント：テロメア、複製起点およびセントロメアを含有しなければならない。

哺乳動物におけるテロメアは、反復配列 (TTAGGG)<sub>n</sub>よりなり、そして染色体末端の複製および安定化に必要であると考えられる。複製起点は、細胞周期のS期の間、染色体DNAの効率的かつ制御された複製に必要である。哺乳動物複製起点は配列レベルではよく特徴付けされていないが、それらは哺乳動物DNAで比較的豊富であると信じられている。最後に、セントロメアは、有糸分裂の間に個々の染色分体が2つの娘細胞に分離するのに必要であり、各娘細胞が各染色体の1つの、および唯一のコピーを受け取ることを確実にする。複製起点と同様に、セントロメアは配列レベルでは明らかにされていない。アルファサテライトDNAは、重要なセントロメア成分であり得る (Haafら, Cell 70:681-696(1992); Larinら, Hum. Mol. Genet. 3:689-695(1994); Willard, Trends in Genet. 6:410-415(1990))。しかし、明らかにアルファサテライトDNAを欠く有糸分裂的に安定な異常染色体誘導体の事例が存在する (Callenら, Am. J. Med. Genet. 43:709-719(1992); Crollaら, J. Med. Genet. 29:699-703(1992); Voullaireら, Am. J. Hum. Genet. 52:1153-1163(1993); Blennowら, Am. J. Hum. Genet. 54:877-853(1994); Ohashiら, Am. J. Med. Genet. 55:1202-1208(1994))。従って、現時点では、哺乳動物セントロメアの組成はあまり理解されないままある。

他の者は哺乳動物細胞における「人工」染色体を生成したことを主張している

が、誰も外因性DNAのみを含有する人工的染色体を生成していない。これら従来

の各事例では、研究者は現存の染色体を改変してより小さくしたか（「ペアーダウン」(pare-down)アプローチ）、あるいは彼らは、外因性DNAを現存の染色体に組み込み、次いで、これを破壊して予め存在する染色体からの内因性配列を含有する染色体フラグメントを生成させたか（「フラグメント」アプローチ）のいずれかであった。本発明においては、外因性DNA配列がヒト細胞に導入され、そして内因性染色体へ組み込まれることなく安定な合成染色体を形成する。

ペアーダウンアプローチにおいては、3つの特定のストラテジーが使用されてきた：(1) 異常な組換えを介するテロメア指向性切形(Barnett, M. A. ら, *Nucleic Acids Res.* 21:27-36(1993); Farr, C. J. ら, *EMBO J.* 14:5444-54(1995)) (2) 相同組換えを介するアルファサテライト標的化テロメア挿入／切形(Brown, K. E. ら, *Hum. Mol. Genet.* 3:1227-37(1994)) (3) 二動原体染色体の形成／破壊(Hadlaczky, G., *Mammalian Artificial Chromosomes*, 米国特許第5,288,625号(1994))。

Barnettら(*Nucleic Acids Res.* 21:27-36(1993))、Farrら(*EMBO J.* 14:5444-54(1995))、およびBrownら(*Hum Mol. Genet.* 3:1227-37(1994))は、テロメアDNAおよび選択マーカーを哺乳動物細胞にトランスフェクトすることによって内因性染色体をフラグメント化する方法を記載している。それぞれの場合で、元の染色体より小さい切形染色体が作製されている。得られた切形染色体は内因性セントロメアを含む大量の内因性染色体配列を含有した。従って、これらの染色体は新たに形成されなかった。

Hadlaczky(*Mammalian Artificial Chromosomes*, 米国特許第5,288,625号(1994))は、二動原体染色体破壊事象の結果として形成された染色体を増やすために使用され得る細胞株を記載している。選択マーカーを除く全ての配列は、元の十分に機能的な二動原体染色体に由来するものであった。従って、これらのいわゆる「人工」染色体は新たに作製されなかった。

「フラグメント化」アプローチにおいては、Haafら(*Cell* 70:681-696(1992))およびPraznovskyら(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:11042-11046(1991))は、トランスフェクトされたDNAを内因性染色体に組み込むことによって染色体

フラグメントを生成する方法を記載している。トランスフェクション後、組み込まれたDNA配列は増幅され（コピー数の増加）、そしていくつかのクローンでは、内因性染色体の一部が破壊して、染色体外に存在するフラグメントを生成する。両文献においては、取り込まれトランスフェクトされたDNAは内因性染色体および染色体外フラグメントに広く見出され得る。

Haafら(Cell 70:681-696(1992))の実験において、ヒトアルファサテライトDNAおよびネオマイシン耐性遺伝子がアフリカミドリザル細胞に同時トランスフェクトされた。他の外因性DNAはいずれのトランスフェクションにおいても含まれなかった。各トランスフェクションクローンにおいて、DNAは内因性染色体に組み込まれることが見出された。染色体外フラグメントを含有することが見出された1つのクローンにおいて、トランスフェクトされたアルファサテライトDNAは、組み込み後、大量に増幅した。著者らは、サザンブロットおよび蛍光インサイチュハイブリダイゼーションに基づいて、アフリカミドリザル配列がトランスフェクトされたDNAとともに同時増幅し、そしてアルファサテライトDNAにおいて散在していると結論した。増幅されたアルファサテライトを含有する染色体のさらなる特徴付けにおいて、「トランスフェクトされた染色体領域の数、サイズおよび染色体位置（テロメア染色体、介在染色体、またはセントロメア染色体）は、3〜31細胞株の集団内において細胞間で変化し、このことがトランスフェクト配列の不安定性を示唆する」ことが見出された。最後に、増幅されたアルファサテライトDNAを含有する染色体の有糸分裂挙動の分析は、後期ブリッジの高発生を明らかにし、染色体が二動原体染色体（または、多セントロメア染色体）であることを示唆した。従って、後期ブリッジ構造の高発生と関連する高度の観察された構造不安定性は、組み込み／増幅／破壊事象からもたらされる染色体フラグメントの考え方と合致する。最後に、組み込まれ、増幅されなかったアルファサテライトDNAを含有するクローンにおいて、染色体外フラグメントが観察されず、増幅がこの方法における染色体フラグメント化工程のために重要であることをさらに示唆したことも注目に値する。

Praznovskyら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:11042-11046(1991))は、非セントロメアヒトDNAフラグメント（後に、McGillら(Hum. Mol. Genet. 1:749-



751(1992))およびCooperら(Hum. Mol. Genet. 1:753-754(1992))によってヒト染色体9qterにマップされることが示された)を内因性染色体に組み込むことによって染色体フラグメントを生成させた。Haafの実験と同様に、組み込まれたトランスフェクトされたDNAは十分に増幅され、そしてマウスゲノム配列と共に分散されていることが判明した。著者らは、トランスフェクトされたDNAの組み込み／増幅の結果、二動原体染色体が形成され、次いで、これは破壊されて染色体フラグメントを生成することを示唆している。染色体フラグメントの分析は、明らかに、染色体フラグメントが組み込まれた増幅されたDNAを含有するマウス染色体に由来したことを示す。

HaafらおよびPraznovskyらによる実験の間には多数の重要な類似性がある。第1に、両者はトランスフェクトされたDNAが内因性染色体に組み込まれたことを示す。第2に、両者は、組み込みの後に、トランスフェクトされたDNAが十分に増幅されたことを示す。第3に、内因性DNA(レシピエント細胞由来のトランスフェクトされていない染色体配列)は増幅された配列全体に分散していることが見出された。第4に、増幅されたトランスフェクトされた配列を含有する内因性染色体は、CREST抗血清で染色された。第5に、増幅されたトランスフェクトされた配列を含有する内因性染色体は、有糸分裂の間に二動原体染色体と同様に挙動した。最後に、増幅されたトランスフェクトされた配列を含有する内因性染色体は構造不安定性を示した。従って、Praznovskyらによる非常に多数の重要な類似性および実証された染色体フラグメント化は、これらの両実験における染色体組み込み／増幅／破壊機構を示す。

アルファサテライトDNAの哺乳動物染色体へのトランスフェクションおよび組み込みが増幅の非存在下で染色体外フラグメントを作製するのに十分ではないというさらなる証拠が、Larinら(Hum. Mol. Genet. 3:689-95(1994))によって得られた。これらの実験においては、選択マーカーに連結されたアルファサテライトDNAがヒト細胞にトランスフェクトされた。すべての薬剤耐性クローンにおいて、アルファサテライトDNAは内因性染色体に組み込まれた。これらの組み込みはセントロメア様構造(すなわち、一次収縮、CREST抗血清染色、および後期の間

のラギング染色体)を形成したが、いずれのクローンにおいても染色体外フラ

グメントは観察されなかった。これらの実験はトランスフェクトされたアルファサテライトDNAは含有するが、内因性セントロメアを含有しない染色体を有するクローンを提供しなかったため、形成されたセントロメア様構造が染色体分離を促進し得るか否かを決定する信頼性のある方法は存在しない。

各「ペアードダウン (pared-down)」染色体は予め存在する染色体から作製されたので、そして、「フラグメント化」染色体の各々はDNAを予め存在する染色体に組み込むことによって作製されたので、これらの参考文献はトランスフェクトされた裸のDNAからいかにして新たに染色体を作製するかについてのガイダンスを提供しない。

さらに、それらを作製するのに使用されるこれらの染色体およびアプローチは、いくつかの理由で遺伝子治療ベクターとしての厳しい制限を有する。第1に、それらを作製するために使用される方法は、細胞培養物において染色体を作製するためにのみ使用され得る。破壊事象は極端に稀でありそして/または予測できない構造を有する染色体を生じるので、これらの方法は親細胞における直接的使用に適合しない。さらに、フラグメント化アプローチにおける増幅された配列の不安定性は、次に、細胞性形質転換およびガンに導き得るゲノム再配置の危険のために、患者での使用に適さない。

それゆえ、患者の細胞に直接的に導入され得る規定された構造を有する予め作製された染色体ベクター、特に、内因性染色体への組み込みおよび続いての増幅に依存しないベクターが存在すれば、そして、細胞における構築物の構造がトランスフェクション前のその構造と実質的に同一であれば、非常に望ましい。

第2に、ペアードダウン染色体および染色体フラグメントは規定されない内因性配列からなり、そして機能的に重要である配列を同定するためのガイダンスを提供しない。

それゆえ、規定された配列からなるベクターおよび他の機能的に重要な配列が迅速に同定されることを可能にするこれらの規定された合成染色体を生成する方法を提供することは非常に望ましい。

第3に、ペアドーダウンおよびフラグメント化アプローチによって生成された染色体は、現在利用可能な技術を用いて実質的に精製され得ない。従って、他の

哺乳動物染色体を送達することなく、これらのペアドーダウン染色体を哺乳動物細胞に送達することは困難である。

それゆえ、細胞に導入され得、そして機能的染色体を形成し得る実質的に精製された遺伝子操作されたDNAを提供することは非常に望ましい。

第4に、これらのペアドーダウン染色体および染色体フラグメントは、現在までのところ、裸のDNAとして単離され、そして細胞に再導入されていないので、任意の内因性DNAが細胞に導入されて、（宿主染色体にまず組み込まれることなく）新たに機能的染色体を生成し得るのかは全く明らかでなかった。

それゆえ、精製されたDNAを哺乳動物細胞に導入することによって、新たに作製される人工哺乳動物染色体を提供することは非常に望ましい。

最後に、新たなDNA配列（例えば、治療遺伝子）をペアドーダウン染色体および染色体フラグメントに付加することは非常に困難である。

それゆえ、新たなDNA配列をベクター上に配置することが直接的かつ効果的である、インビトロで作製されるベクターを提供することは非常に望ましい。

Sunら(Nature Genetics 8:33-41(1994))は、ヒト細胞で使用されるように設計されたウイルスベースのベクター系を記載している。このベクターは「ヒト人工エピソード染色体」として記載されている。しかし、このベクターはEBNA-1（毒性かつ免疫原性のウイルスタンパク質）の存在に依存している。さらに、このベクターは天然の哺乳動物染色体複製起点ではなくウイルスの複製起点に依存している。さらに、「染色体」は機能的なセントロメアDNAもテロメアDNAも含有せず、そして有糸分裂の間に機能的キネトコアを形成しない。その結果、このようなベクターは制御された様式では分離されない。最後に、このベクターは、内因性染色体とは異なって、細胞当たり50～100コピーの範囲である増大したコピー数で細胞内に存在する。哺乳動物染色体を規定するためのこれらの基準に基づき、このベクターは、それが無関係の機構によって異なる特性および機能を有するので、「ヒト人工染色体」と適切に称され得ない。

従って、インビトロで操作され得、そして細胞へのトランスフェクションに際して、機能的染色体構造をとり、かつ制御された様式で遺伝子発現を指向するDNAから作製された全合成または人工染色体に対する明らかな要望が依然として存在する。

大きく、高度に反復性のDNAをクローニングする能力は、ヒト人工マイクロ染色体、および遺伝子治療ベクターの開発および構築に向けての重要な工程である。さらに、微生物における反復DNAの安定なクローニングは哺乳動物染色体の高分解性物理的地図を作成するために重要である。

外来DNAの微生物におけるクローニングおよび増殖を容易にするために、種々のクローニング系が開発された。プラスミド、バクテリオファージおよび酵母人工染色体 (YAC) が成功して使用されて多くの哺乳動物DNA配列がクローニングされている。しかし、いくつかのタイプの反復DNAはこれらのベクター中で構造的に不安定であるようである (Schalkwykら, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6(1):37-43(1995)); Brutlag, D. ら, *Cell*. 10:509-519(1977))。この結果、物理的ゲノム地図にギャップが生じ、そして高度に反復性の哺乳動物セントロメアDNAを増殖させる手段としてのこれらのベクターの使用を排除する。

細菌人工染色体 (BAC) が構築されて、*E. coli*における大きなDNAフラグメントのクローニングが可能となった (O'Connerら, *Science* 244(4910):1307-12(1989); Shizuyaら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(18): 8794-7(1992); Hosodaら, *Nucleic Acids Res.* 18(13):3863-9(1990))。この系は少なくとも300 kbまでの哺乳動物DNAを安定に増殖させ得るようであるが、比較的少数の独立した哺乳動物DNAフラグメントのみが分析されている (Shizuyaら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(18):8794-7(1992))。さらに、BACベクターにおいて構造的安定性について試験された少数のフラグメントは、各フラグメントに存在する配列のタイプに関して十分には特徴付けられていない。従って、これらのフラグメントが反復DNAエレメントを含有するかは知られていない。特に、制限部位およびサザン分析に基づいて、これらのフラグメントがアルファサテライトDNAを含有しないことは明らかである。

多くの哺乳動物DNA配列は酵母人工染色体（YAC）において構造的に安定であるようであり、そしてなお同様の長さの特定の反復エレメントは構造的に安定ではない(Neilら, Nucleic Acids Res. 18(6):1421-8(1990))。YAC系に由来するDNA特性の知識は、従って、反復単位の大きな整列が、非反復DNAからなる同様のサ

イズのDNAが安定である条件下でさえ、本来不安定であることを示唆する。従って、BACベクターにおけるアルファサテライトDNAにおいて見出されるような反復単位の大きな（100 kbを超える）整列の構造的安定性は、いかなる合理的確実性を有しても予測し得ない。さらに、たとえいくつかのアルファサテライト整列がBACベクターにおいて構造的に安定であっても、直感的には、セントロメア機能を促進するに十分にサイズおよび配列組成の整列がこのベクターにおいて安定に増殖され得るかは明らかではない。

引用される技術とは対照的に、本発明のいくつかの実施態様は、患者の細胞に直接的に導入され得る規定された構造および組成を有する予め作製された染色体ベクターを記載する。本発明で記載されるベクターは内因性染色体への組み込みおよびその後の増幅に依存しないので、細胞中での構築物の構造はトランスフェクション前のその構造と実質的に同一である。

引用される技術とは対照的に、本発明で記載されるベクターは、規定された配列からなる。さらに、これらの合成染色体を生成するために使用される方法は、他の機能的に重要な配列が迅速に同定されることを可能にする。

引用される技術とは対照的に、本発明をもって、本発明者らは、人工哺乳動物染色体が、精製したDNAを哺乳動物細胞に導入することによって新たに作製され得ることを最初に実証する。

引用される技術とは対照的に、本発明で記載されるベクターはインビトロで作製されるので、新たなDNA配列をベクター上に配置することは直接的かつ効率的である。

#### 発明の要旨

本発明の目的は、反復DNA、特にアルファサテライトDNAの均一またはハイブリッド合成整列の構築方法を記載することである。本発明のさらなる目的は、反復

DNA、特に天然に存在するかまたは合成のアルファサテライト整列をクローニングし、増殖させ、そして安定に組換え産生する方法を記載することにある。

従って、本発明は、大きな反復DNA配列を安定にクローニングする方法、前記整列を含有するベクター、およびこのようなベクターで形質転換した宿主に関する。

る。

本発明者らは、長さが736kbまでの大量の精製されたインタクトなアルファサテライト整列を産生する方法を開発した。テロメアDNAおよびヒトゲノムDNA配列と共にこれらの整列をヒト細胞にトランスフェクトすることによって、選択の非存在下で高い程度の有糸分裂安定性を示すいくつかの全合成ヒト染色体が産生された。

それによって人工哺乳動物染色体を生成しようとする試みがなされた以前のアプローチとは異なり、このアプローチは既存の内因性染色体の改変に依存しない。さらに、これは内因性染色体内の複数の組み込み事象を生じない。これらの染色体は染色体外で形成され、そして維持され、従って、内因性染色体への組み込みは回避される。

比較的高頻度の合成染色体形成および染色体形成に伴う他のゲノム再配置の欠如は、本発明者らによって作製された合成染色体が異種遺伝子発現および遺伝子治療用の効果的なベクターとして使用されることを可能にする。

従って、本発明は、単離精製されたDNA単独によって、合成または人工染色体が細胞において新たに（精製DNAから）産生され、そして染色体外エレメントとして産生されそして維持されるという本発明者らの知見に基づいている。この染色体は、それが、丁度、天然に存在する染色体が遺伝されるように、選択圧なしに分裂中の哺乳動物細胞において組み込まれていない構築物として安定に維持される点で、天然の哺乳動物染色体の必須な機能を保持する。直鎖状染色体については、これはセントロメア、テロメア、および複製起点の機能を示す。

従って、本発明は、合成または人工哺乳動物染色体に関する。この染色体は単離精製されたDNAから産生される。この単離精製されたDNAは哺乳動物細胞にトランスフェクトされる。内因性染色体に組み込まれることなく、それは機能的染色

体を形成する。この染色体は、インサイチュで内因性の天然に存在する染色体に由来しない。出発材料は単離精製されたセントロメアDNAおよび組み込みなしで染色体形成を可能にするDNAである。直鎖状染色体については、テロメアDNAが含まれる。好ましい実施態様において、組み込みなしで染色体形成を可能にするDNAは（生物の天然に存在するゲノム由来の）ゲノムDNAである。

従って、人工哺乳動物直鎖状染色体は、好ましくは、本質的にセントロメアDNA、テロメアDNA、およびゲノムDNAを含む。1つの実施態様において、人工染色体は環状染色体である。この場合、テロメアDNAは存在しない。なぜなら、染色体末端を複製する必要がないからである。

ゲノムDNAは、制限酵素消化フラグメント、ゲノムDNAの機械的剪断によって生じたフラグメント、またはインビトロで合成された合成フラグメントであるサブゲノムDNAフラグメントである。ゲノムDNA出発材料（すなわち、トランスフェクトされたもの）は、異種フラグメント（例えば、制限消化物）の混合物であり得るが、またはクローニングされたフラグメント（同種）であり得る。

セントロメアDNAはキネトコア形成を指向または支持し、それにより適切な染色体分離を可能とするDNAを含む。免疫蛍光または免疫電子顕微鏡によって示されるように、活性で機能的なセントロメアにおけるセントロメアDNAは、有糸分裂の間にCENP-Eと会合している。「会合」とは、セントロメアDNAおよびCENP-Eが蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）および免疫蛍光によって共に局在化される（co-localize）ことを意味する。

テロメアDNAは、テロメア機能を提供する、すなわち直鎖状DNA分子の末端を複製するTTAGGGのタンデム反復を含む。テロメアDNAは、直鎖状染色体が所望される場合に使用される、任意の成分として含まれる。これは、本明細書では、用語「テロメア性」／「テロメア」を括弧に入れることによって示される。

トランスフェクションの前に、DNAを裸にし、1つ以上のDNA凝縮剤で凝縮させ得るか、または1つ以上のDNA結合タンパク質によって被覆し得る。

本発明はまた、哺乳動物細胞に前記の単離精製されたDNAを導入するプロセスによって産生された人工哺乳動物染色体に関する。好ましい実施態様においては

、このプロセスは、本質的にセントロメアDNA、テロメアDNA、およびゲノムDNAを含むDNAを使用する。

種々のフラグメントを別々にトランスフェクトし得るか、または1つ以上のフラグメントをトランスフェクションの前に連結し得る。従って、セントロメア（テロメア）DNAおよびゲノムDNAは別々に導入されるか（連結されない）、または1つ以上の単離精製されたDNAは互いに連結される。

本発明はまた、人工哺乳動物染色体を含む哺乳動物細胞および人工哺乳動物染色体を含む組成物に関する。

本発明はまた、前記の単離精製されたDNAに関し、これは、哺乳動物細胞に導入された場合に人工哺乳動物染色体を形成する。好ましい実施態様において、単離精製されたDNAは本質的にセントロメアDNA、テロメアDNA、およびゲノムDNAを含む。

本発明はまた、精製DNAを含む哺乳動物細胞および精製DNAを含む組成物に関する。

本発明はまた、精製DNAを含むベクターに関する。

本発明はまた、このベクターを含む哺乳動物細胞およびこのベクターを含む組成物に関する。

本発明はまた、1つ以上の前記のDNAを組み合わせるプロセスによって産生された前記の単離精製されたDNAに関する。好ましい実施態様において、このDNAは：(1) セントロメアDNA、(2) テロメアDNA、(3) ゲノムDNAを含む。このDNAは非連結であり得るか、または1つ以上が互いに連結され得る。

本発明はまた、哺乳動物細胞に前記精製DNAを導入することによって人工哺乳動物染色体を作製する方法に関する。

本発明はまた、人工染色体を形成し得るDNAを作製する方法に関し、この方法はインビトロで前記のDNAを組み合わせる工程を包含する。

本発明はまた、精製DNAを哺乳動物細胞に導入し、そして染色体を複製させることによって、哺乳動物細胞において人工染色体を増殖させる方法に関する。

好ましい実施態様において、本発明はまた、異種遺伝子を人工哺乳動物染色体



から発現させることによって、哺乳動物においてその遺伝子を発現させる方法に関する。

従って、本発明はまた、目的の遺伝子が発現されるように、所望の遺伝子を人工染色体に含ませることによって、所望の遺伝子産物を提供する方法に関する。好ましい実施態様において、本発明は、染色体を含有する哺乳動物に対する治療的效果が存在するように、異種治療的DNAを人工哺乳動物染色体に含ませることによる、遺伝子治療の方法を提供する。

本発明の好ましい実施態様において、セントロメアDNAはアルファサテライトDNAである。

本発明の好ましい実施態様において、人工哺乳動物染色体はヒトDNA配列に全体が由来し、そしてヒト細胞において機能的である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明の方法の模式図である。数字「1～16」は直鎖状整列にタンデムに配置された、アルファサテライトDNAの1～16コピーの（約171bpの）モノマー単位を表す。「X」は、所望のサイズへのその拡大の間に整列を有するベクターの骨格における所望の制限酵素部位を表す。

図2は組換え%（50世代後）および整列サイズ（kb）の相関のグラフ表示である。

図3。アルファサテライトDNAの大きな頭-尾タンデム整列を産生するための方法。pVJ104-Y $\alpha$ 16をBamHIおよびSfiIで直鎖状化し、そしてパルスドフィールドゲル電気泳動（PFGE）によって精製した。同様に、pBac-Y $\alpha$ 16をBamHIおよびBglIIで直鎖状化し、そしてアルファサテライト整列をPFGEによって精製した。A）精製された整列をリガーゼ、BamHIおよびBglIIの存在下で一緒にインキュベートした。BamHIおよびBglIIは相補的／アイソシゾマー突出であるので、（頭-尾連結の場合と同様に）BamHI/BglII連結を生じる事象は、両部位を破壊する。従って、頭-尾連結はBamHIおよびBglIIによる切断に対して耐性である。対照的に、頭-頭、または尾-尾連結事象は、それぞれ、BamHIまたはBglII部位を再生する。BamHIおよびBglIIが存在するので、これらの連結産物は、切断されてそれら

の構成モノマー（または頭-尾マルチマー）を生じる。リガーゼの量を制御することによって、インキュベーション時間、およびDNAの濃度、頭-尾産物の長さが必要に応じて変化され得る。B) 連結後、この産物をPFGEによって分析した。レーン1、分子量標準品（NEBL Midrange II マーカー）；レーン2、BamHIおよびBglIIの存在下で4時間連結したYα16（BamHI/BglIIフラグメント）、レーン3、BamHI/BglIIの存在下で12時間連結したYα16（BamHI/BglIIフラグメント）；レーン4、BamHIおよびBglIIの存在下でモック連結したYα16（BamHI/Bgl

IIフラグメント）；レーン5、制限酵素なしで12時間連結したVK75（BssHIIフラグメント）；レーン6、BssHIIの存在下で12時間連結したVK75（BssHIIフラグメント）；レーン7、モック連結したVK75（BssHIIフラグメント）。連結産物の分子量を左側に示す。註：これらの試料を同一ゲルで泳動したが、レーン4と5との間のいくつかの無関係なレーンを除去した。

図4. 合成染色体を作製するための戦略

図5. 蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）によるクローン22-7および22-13由来の合成染色体の分析。細胞を回収し、スライドガラス上に滴下し、そして実験手順（本明細書の実施例を参照のこと）に記載のようにYアルファサテライトDNAにハイブリダイズさせる。ビオチン化プローブを、テキサスレッドアビジンを用いて検出し、そしてビオチン化抗-アビジンおよびテキサスレッドアビジンの2層を用いて増幅した。A) クローン22-7由来の中期塗布物のDAPI画像。B) トリプルキューブフィルター（triple cube filter）を用いてアルファサテライトプローブを可視化した以外はA) と同じ。C) クローン22-13由来の中期塗布物のDAPI画像。D) トリプルキューブフィルターを用いてアルファサテライトプローブを可視化した以外はC) と同じ。各々の場合において、合成染色体を白矢印で示す。

図6. FISHによるクローン22-6および23-1由来の合成染色体の分析。細胞を回収し、スライドガラス上に滴下し、そして実験手順に記載のようにYアルファサテライトDNA（クローン22-6）または17アルファサテライトDNA（クローン23-1）にハイブリダイズさせた。ビオチン化プローブを、テキサスレッドアビジ

ンを用いて検出し、そしてビオチン化抗-アビジンおよびテキサスレッドアビジンの2層を用いて増幅した。A) クローン22-6由来の中期塗抹物のDAPI画像。B) トリプルキューブフィルターを用いてアルファサテライトプローブを可視化した以外はA)と同じ。C) クローン23-1由来の中期塗抹物のDAPI画像。D) トリプルキューブフィルターを用いてアルファサテライトプローブを可視化した以外はC)と同じ。各々の場合において、合成染色体を白矢印で示す。D)において、黄色矢印は組み込み部位におけるC群染色体の位置を示す。

図7。FISHによるクローン22-11および17-15由来の合成染色体の分析。細胞

を回収し、スライドガラス上に滴下し、そして実験手順に記載のようにYアルファサテライトDNA（クローン22-11）または17アルファサテライトDNA（クローン17-15）にハイブリダイズさせた。ビオチン化プローブを、テキサスレッドアビジンを用いて検出し、そしてビオチン化抗-アビジンおよびテキサスレッドアビジンの2層を用いて増幅した。A) クローン22-11由来の中期塗抹物のDAPI画像。B) トリプルキューブフィルターを用いてアルファサテライトプローブを可視化した以外はA)と同じ。C) クローン17-15由来の中期塗抹物のDAPI画像。D) トリプルキューブフィルターを用いてアルファサテライトプローブを可視化した以外はC)と同じ。各々の場合において、合成染色体を白矢印で示す。

図8。合成染色体を含有するクローンに存在するトランスフェクトされたアルファサテライトDNAの量の測定。A) 実験手順に記載のように、全ゲノムDNAを回収し、消化し、そして電気泳動した。レーン1、HT1080；レーン2、クローン22-6；レーン3、クローン22-7；レーン4、クローン22-11；レーン5、クローン22-13；レーン6、クローン23-1。B) 合成YアルファサテライトDNAの概算された量を各クローンについて示す。註：クローン23-1を17アルファサテライトDNAでトランスフェクトし、それゆえ、合成YアルファサテライトDNAを含有しない。

図9。CENP-Eは有糸分裂の間に合成染色体と会合している。免疫蛍光を、実験手順に記載のように合成染色体含有クローンから回収した中期染色体に対して行った。A) クローン22-11由来のDAPI-染色染色体。B) 抗CENP-E抗体の位置を

トリプルキューブフィルターを用いて可視化する以外はA)と同じ。C) クローン23-1由来のDAPI-染色染色体。D) 抗CENP-E抗体の位置をトリプルキューブフィルターを用いて可視化する以外はC)と同じ。各々の場合において、合成染色体を白矢印で示す。

図10. 選択の非存在下における70日間の増殖の後のクローン22-11のX-Galプレート染色。本明細書における実験手順に記載のように細胞を回収し、そして染色した。A) HT1080 B) クローン22-11。HT1080ではなくクローン22-11における青色細胞の存在は、 $\beta$ -geoがこれらの細胞中でなお発現されていることを示す。

#### 好ましい実施態様の詳細な説明

本発明者らは、機能的哺乳動物染色体を、哺乳動物細胞に導入された精製DNAから構築し得ることを見出した。種々の適用のためにこれらの染色体を用いることにはいくつかの利点がある。

第1に、それらは形成されそして自律的に複製されるので、それらは宿主ゲノムへの挿入によって挿入変異誘発を生じない。

第2に、導入ベクターの大きなサイズ（メガベース範囲）のために、全てのその調節エレメントを含めた大きな遺伝子の全体のレパートリーを収容する能力がある。これ自体がメガベースのDNAを含み得る。

第3に、いくつかの遺伝子疾患は1より多い遺伝子の欠損の結果であるので、哺乳動物人工染色体の大きなサイズのために、1より多い遺伝子を収容し得る。

第4に、この染色体は安定であり、従って、多くの細胞分裂にわたって治療的恩恵を提供し得る。

第5に、染色体は非免疫原性である。

従って、本発明の方法は、DNAの構造的にインタクトな高度に反復性の領域を産生するための微生物における方法を提供し、これは、人工染色体の構築において利用される。規定された長さ、組成、方向および位相（phasing）の整列が可能である。「適切な位相」とは、整列における任意の所定の高次反復の正確な長さおよび方向が、整列の構築により天然に生じる配列におけるそれから変化され

ず、そしてまた、反復単位の連結部において非反復DNAが存在しないことを意味する。例えば、アルフォイド配列については、高次反復単位の長さおよび方向は天然に存在する高次反復と正確に同じであり、そして制限部位を作製するために改変された塩基を除いて、高次反復の連結部に存在する非アルフォイド配列は存在しない。

従って、DNAの反復タンデム整列をクローニングするための方法が提供され、ここで、第1のDNA単位が、DNA単位の反対の末端が相補的であるが非アイソソマー制限部位を含有するように調製される。このDNAをベクターに連結し、そしてこのベクターを制限部位の1つにおいて直鎖状化する。次いで、工程(a)に

おけるように調製された第2のDNA単位を第1の単位とタンデムに連結して、方向付けられた反復整列を形成する。この整列を宿主細胞、特に細菌宿主細胞に形質転換し、そしてこの整列を含有する安定なクローンを選択する。ベクター直鎖状化で出発し、これらの工程を所望の整列サイズに到達するまで繰り返す。

本発明の方向付けられたクローニングスキームを図1に示し、ここで、アルファサテライトDNA高次反復のクローニングが例証される。図に示すように、本発明の方法は「ビルドアップ(build-up)」アプローチを利用し、ここで、より短い単位、好ましくは高次反復と一緒に加えて、反復単位のより長いタンデム整列を作製する。この単位を、規定された方向を生じる様式で互いに加え、これは、2つの異なる制限部位(各反復単位の各末端におけるもの)によって確立される。好ましくは、タンデム整列の基礎である反復単位、特に高次反復単位は、相補的であるが非アイソソマーの制限部位を反対の末端に含む。このような末端は、ポリメラーゼ連鎖反応のような方法を用いて単位中に設計され得る。本発明の方法においては、相補的末端によって、相補的突出末端および平滑末端の両方を含めることが意図される。

好ましい実施態様において、DNA整列はアルフォイドDNAである。実施例1に示すように、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて、相補的制限部位(BamHIおよびBglII)がヒト第17染色体からの高次レジスターのアルファサテライト反復の反対の末端で作製されるように、単一の2.7kb DNAアルフォイド単位(実際の長さ2.712 k

b)を増幅し得る。高次反復の末端は、相補的制限部位が各反復の反対の末端に生じるように、ポリメラーゼ連鎖反応媒介性部位特異的変異誘発を用いて改変し得る。次いで、改変された高次反復をミニFクローニングベクターpBAC108L (Shizuya, H. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8794-8797 (1992)、本明細書中に参考として援用される) にクローニングする。これらの相補的制限部位を、非相補的な隣接する制限部位と共に使用して、単一の改変された高次反復に由来するアルファサテライトDNAの合成整列に直接的にクローニングする(図3)。合成整列は、第17染色体、Y染色体、または他の染色体に由来するようなアルフォイドDNAを含む、任意の高次アルフォイド反復から作製され得る。さらに、両方の染色体由来の高次反復からなるハイブリッド整列が調製され得る。好ましい

実施態様において、DNAはヒトDNAである。

200~215 kbまでの整列は、本発明のベクターおよび宿主において安定である。1つの実施態様において、長さが87 kb~215 kbの整列が構築される。好ましい実施態様において、長さが少なくとも100 kbの整列が構築される。高度に好ましい実施態様において、長さが少なくとも140 kb、特に少なくとも174 kbの整列が構築され；174 kbの整列は機能的アルファサテライト整列の最小の公知の観察された長さを超える。

このような部位を作製するに有用な相補的であるが非アイソシゾマーの制限酵素の例としては：SalIおよびXhoI；MunIおよびEcoRI；AflIIIおよびNcoI/StyI (アイソシゾマー：いずれもが非アイソシゾマーパートナーのためのパートナーであり得る)；NheIおよびXbaIおよびStyI/AvrII (アイソシゾマー) およびSpeI (任意の組合せ)；ClaIおよびBstBIおよびAccI (任意の組合せ)；MluI/AflIII (アイソシゾマー) およびBssHIIおよびAscI；ならびにNotIおよびEagIが挙げられる。BclIは、BamHIおよびBglIIの両方の相補的/非アイソシゾマーである。

次いで、増幅されたDNAを、例えば、(1) BamHIおよびSfiI、または(2) BglIIおよびSfiIを用いて消化する。例えば、ゲル電気泳動のような、このようなDNAを分離し得る物理的方法を用いる、消化されたDNA中のバンドの分離後に、1つの消化物由来のDNAバンドを切り出し、そして他の消化物から切り出されたDNAバ

ンドに連結させる。前記の例においては、BglIIおよびBamHIは適合性突出を生じ、そしてSfiIは特定の方向でのみ再連結し得る非対称突出を生じるので、これらの部位に隣接するDNAをベクターDNAに連結して、頭-尾様式で整列したタンデムダイマーを作製する。次いで、このDNAを微生物に形質転換し得る。

このストラテジーの第2の変形において、BamHIおよびBglIIが、平滑切断制限酵素に置換され得る。例えば、それぞれBamHIおよびBglIIが、SmaIおよびEcoRVに置換され得る。次いで、消化およびフラグメント単離を前記のように行う。平滑および相補的/非アイソソマーの両方の変形に共通したこのストラテジーの重要な特徴は、整列の生理学的位相が、必要であれば、正確に維持され得ることである。使用され得るさらなる平滑切断物の例としては、SspI、StuI、ScaI、Pml、PvuII、Ecl136II、NaeI、EheI、HincII、HpaI、SnaBI、NruI、FspI、DraI、MscI、Bst107I、AluI、

Asp700/XmnI、AviIII、brPII、Bst1107、Eco47III、DpnI、HaeIII、HindII、amI、MluMI、MvnI、RsaI、SwaI、Bsh1236I、Eco72I、PaiIおよびSrfIが挙げられる。

微生物DNA中に合成アルファサテライトの大きなタンデム整列を含有するクローニングされたプラスミドの構造的安定性は、実施例2に記載した単純増殖および希釈実験を用いて測定し得る。例えば、構造的安定性は、50世代の継代および続いての構造的一体性のためのプラスミドDNAの分析によって測定し得る。プラスミドの構造は、制限分析およびアガロースゲル電気泳動によって分析し得る。これらのクローンでほとんどまたは全く組換えは観察されず、これは、方向性クローニングスキームを用いて、(pBAC108Lベクターのような)ミニ-Fクローニングベクターおよび適当なE. coli宿主中に合成アルファサテライト整列を構築し、増殖し得ることを示す。

本発明の方法を用いて、任意の所望の反復性DNA単位を構築し得る。例えば、任意の真核生物染色体、特にヒトDNAからのアルファサテライトDNAもクローニングし得る。高度に反復性のDNAの大きなタンデム整列の他の例は、免疫グロブリンDNA遺伝子座、ヘテロクロマチン反復の領域、およびテロメアを含む。

本発明の方向性クローニング法は、内因性（非修飾）整列をクローニングする場合に必要な、多形制限部位の存在を必要としない。たとえ存在する場合でも、これらの部位は整列の正確なサイズの制御を許容しない。さらに、本発明の方法で使用されるような単一の高次反復（図1参照）、および続いてのそのサイズの2倍化によって、全整列の正確な配列が知られる。なぜなら、元の高次反復の配列は既知であるからである。

例えば、内因性アルファサテライト整列のような内因的整列をクローニングする場合、所定の整列の正確な組成を信頼し得ない。特に、非反復性DNAによる整列の分断は、E. coliにおける安定性に有意な影響を有し得る。さらに、遺伝子治療用のベクターとして適切であるためには、このような治療のレシピエントに提供されるべきベクターの正確な配列を知らなければならない。本発明の方法は、その心配を取り除き、そして既知の反復配列から有用な整列を新たに構築するのに好都合なように、当業者が天然アルファサテライト整列の配列決定を回避し得る。

構造的に発散した高次オーダー反復は、一般に、より相同な整列に対してE. coliにおける構造的安定性の増加を示す。従って、本発明の方法に従って相同合成整列を利用することによって、ベクター中の反復DNAの最小安定性の正確な測定が得られ得る。

ベクターが安定に維持される任意の所望の細菌宿主を宿主として使用し得る。特に、E. coliは、BACベクターおよびBAC系を利用する場合に有用である。

(1) 合成アルファサテライト整列をヒトまたは他の哺乳動物細胞株にトランスフェクトすることによって；(2) ランダムにクローニングしたヒトDNAまたは特異的DNAフラグメントと組み合わせて合成アルファサテライト整列をヒトまたは他の哺乳動物細胞株にトランスフェクトすることによって；(3) アルファサテライト含有エピソームDNAの有糸分裂安定性を増強するテロメアDNA、マトリックス付着領域および／または他の染色体遺伝子座のような非連結特異的染色体成分と共に合成アルファサテライト整列をヒトまたは他の哺乳動物細胞株に同時トランスフェクトすることによって、合成アルファサテライト整列を合成ヒト染色



体の構築で利用し得る。不安定な形態が経時的に失われるので、非連結形態におけるこれらの成分の同時トランスフェクションは、トランスフェクトされた細胞株が無数の構造的順列を構築することを可能とし、保持されるべき最も有糸分裂的に安定な形態を可能とする。標準的な方法および手法を利用して、安定なコンフォメーションを連続的に収集し得る。選択圧の非存在下で有糸分裂安定性を示す構築物を単離し、続いて遺伝子、リボザイムまたはアンチセンス転写物のような1以上の治療的に有用なものを含有する遺伝子治療ベクターの調製で利用し得る。

従って、実質的に本発明は、セントロメア、ゲノムおよび必要に応じてテロメアDNAよりなる合成または人工哺乳動物染色体に関する。別の実施態様において、人工染色体は環状染色体である。この場合、テロメアDNAは染色体末端を複製するのに必要でないので存在しない。この染色体は、最小で、哺乳動物細胞における必須染色体機能を提供するDNA配列を有する。

ゲノムDNAは、制限酵素消化フラグメント、機械的に剪断したフラグメント、およびインビトロで合成したDNAのフラグメントよりなる群から選択されるサブ

ゲノムDNAフラグメントである。染色体のゲノムDNA成分はサブゲノムフラグメント（例えば、制限酵素消化物）の混合物、またはクローニングされたフラグメント由来であり得る。

ゲノムDNAの機能は2倍である。このDNAは遺伝子産物を発現するか、または遺伝子産物の発現を引き起こし（例えば、調節機能を有することによって）、そしてこのDNAは、精製されたDNAの細胞中の内因性染色体への組み込みなしで、細胞中で精製されたDNAからの人工染色体の形成を許容する。この人工染色体はまた、セントロメアDNAおよび必要に応じて、テロメアDNAを含有する。ゲノムDNAは任意の生物に由来するものであり得、そして任意のサイズであり得る。

合成哺乳動物染色体の成分を形成するゲノムDNAは、細胞が由来し、染色体が複製する哺乳動物以外の哺乳動物供給源から由来するものであり得る。例えば、マウスゲノムDNAをヒト細胞に提供し得、ヒトゲノムDNAを他の哺乳動物の細胞に供し得る。さらに、それはセントロメアまたはテロメアの供給源とは異なる供給

源からのものであり得る。

なおさらに、本明細書で例示されるゲノムDNAの機能は、原核細胞生物を含む任意の生物のゲノムDNAによって、およびインビトロで合成されそして天然に存在する配列に対応しない、天然に存在する配列に部分的に相同であるかまたは完全に非相同なDNAによって潜在的に実行され得る。

セントロメアDNAは、セントロメア形成を指向するかまたは支持するDNAを実質的に含み、そしてそれにより、適切な染色体分離を可能とする。この活性で、機能的なセントロメアDNAは、免疫蛍光または免疫電子顕微鏡によって示されるように有糸分裂の間にCENP-Eと会合する。「会合」は、セントロメアDNAおよびCENP-EがFISHおよび免疫蛍光により同時に局在化されることを意味する。

本発明の好ましい実施態様において、セントロメアDNAはアルファサテライトDNAである。しかし、任意の機能的セントロメアDNA、および特に反復性DNAが、本明細書に記載される方法によって可能となり、そして人工染色体を作製するのに有用である。

本発明者らは、大きなアルファサテライト整列を生産するインビトロ法を作製した。以前は、200kbより大きい構造的にインタクトなアルファサテライトDNAを、

哺乳動物細胞のトランスフェクションに必要な量にて精製するのに利用することを可能にする方法はなかった。これらの方法を用いることによって、制御された量のアルファサテライトDNAをインビトロで生産し得る。本明細書に記載されるように、リガーゼの量、インキュベーション時間、およびDNAの濃度を経験的に制御することによって、最終産物の長さを必要に応じて変化させ得る。

しかし、本発明はアルファサテライトDNAに由来するセントロメアDNAに限定されない。本発明によって作製されるこのインビトロ法は、本明細書に記載されるような機能を任意のセントロメアDNAに適用し得、特に反復性DNAに適用し得る。

さらに、全アルファサテライト反復は、セントロメア形成に必要ではない。従って、セントロメアDNAはまた、アルファサテライト誘導体およびアナログ、例えば、アルファサテライトまたは関連サテライトDNAにおけるサブモノマー領域

を含み得る。

タンパク質結合部位を表すアルフォイドモノマー内のサブ領域を共に連結して、より小さい反復単位よりなる機能的なセントロメアを生成し得る。この実施態様の機能はマウス-ヒトハイブリッドからのデータによって示される。

ネズミ種 *M. musculus* において、マイナーサテライトDNAはCENP-Bボックスを含有し、そしてアルファサテライトDNAの機能的等価物であるようである。興味深いことには、*M. musculus* において、マイナーサテライト反復単位は120bpに過ぎず、CENP-Eボックスの外側のアルファサテライトDNAに相同な見掛けの配列を有しない。反復サイズおよび配列の相違にもかかわらず、ヒト染色体はマウス/ヒトハイブリッドで効果的に分離される。これは、セントロメア反復単位のサイズおよび配列がセントロメア機能を破壊することなく変化し得ることを示す。

ネズミ種 *M. caroli* は、マイナーサテライトDNAを欠陥するようである (Kiplin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 15:5009-4020 (1995))。この種において、機能的アルファサテライト等価物は、CENP-Eボックスを含有する79bpサテライト配列であるようである (79bp配列に対して97%相同であるが、CENP-Eボックスを欠く60bp配列がまた存在する)。*M. musculus* と *M. caroli* との間の交差において、兩種由来の染色体は同一細胞内で通常は分離する。これは、マイナーサテライトおよび79bpサテライト配列の両方が、有糸分裂の間に同一の紡錘体によって認識されるこ

とを示す。従って、異なるセントロメア反復サイズは機能的であり得る。

アルファサテライト、マイナーサテライト、および79bpサテライト反復は異なるサイズであり、かつ機能的であるので、絶対的な反復サイズそれ自体はセントロメアDNAの機能の決定要素ではない。さらに、これらのセントロメア反復の間には限定された配列相同性しかないので、タンパク質結合性部位を表す反復内のサブ領域は重要な機能的成分であるようである。

従って、本発明の1つの実施態様において、セントロメアDNAはアルファサテライトDNA内のサブ領域を含有する。好ましい実施態様において、セントロメアDNAは、配列5' aTTCGttggAaaCGGGa 3' (配列番号1) によって規定された、タンデムに連結されたCENP-Bボックスよりなる。ここで、大文字/太字で示される塩基

はCENP-B結合で最も重要であり、小文字で示された塩基は他の塩基で置換し得る。

他の実施態様において、他の種由来のアルフォイド等価物をセントロメアDNAに対して用いる。ヒトおよび他の哺乳動物染色体は、種間体細胞ハイブリッドによって示されるように、他の種由来の細胞において効率的に分離することが示されている。これらのハイブリッドの例は、マウスxヒト、ハムスターxヒト、ラットxヒト、ハムスターxマウス、ラットxマウス、およびニワトリxヒトを含む。ニワトリ細胞において分離するヒト染色体の能力(Dieken, E. ら, Nature Genet. 12:174-182(1996))は、ヒトセントロメアDNAがまた非哺乳動物種(例えば、鳥類)で機能することを示す。

交雑種ハイブリッドからの観察に基づいて、1つの種由来の染色体は他の種において機能することが明らかである。従って、アルファサテライトDNAの代わりに、またはそれと組み合わせて、他の哺乳動物(および鳥類)由来のセントロメア反復を用いて、合成染色体をヒト細胞中で生産し得る。逆に、アルファサテライトDNAを、他の哺乳動物(鳥類)種におけるセントロメアDNAの供給源として使用し得る。

従って、本発明のさらなる実施態様において、ゲノム(テロメア)DNAは、*M. musculus*のマイナーサテライトDNA、*Mus caroli*の79bpサテライトDNA、または他の哺乳動物由来の類似の配列と共に細胞にトランスフェクトされる。別の実施態様において、テロメアDNAおよびゲノムDNAを、鳥類細胞由来のセントロメアDNA

と共に細胞にトランスフェクトする。

本質的には、有糸分裂の間にCENP-Eと会合するセントロメアDNAは、宿主細胞に対する異種のセントロメア配列の使用および他の合成染色体成分の使用を含む本発明のこの局面において具体化される。染色体におけるセントロメア配列が有糸分裂の間にCENP-Eと会合する限りは、ゲノム配列およびテロメア配列とは無関係に、そしてそのため特異的セントロメア配列とは無関係に、哺乳動物細胞に対して機能的な染色体が得られることが予測される。

テロメアDNAは、テロメア機能を保持する任意のDNA配列(任意の所望の種由来

の)に由来し得る。哺乳動物および他の脊椎動物において、染色体末端において最も豊富でかつ保存された配列はTTAGGGであり、これは2〜20キロベースの長さの整列を形成する。ヒトテロメアDNAは約5キロベースの反復TTAGGGからなり、この配列の小さいストレッチは、哺乳動物細胞への直鎖状分子の導入後のテロメア形成を促すのに十分である(Juxley, C. Gene Ther. 1:7-12(1994))。単純な(TTAGGG)<sub>n</sub>整列は、人工染色体によって必要とされるテロメア機能を提供するのに十分である。従って、このテロメアDNAはヘキサマーTTAGGGのタンデムな整列を含む。テロメアDNAは、直鎖状染色体の形成が望まれる場合に含まれる。

テロメア、セントロメアおよび複製起点は、Huxley, C.ら, Biotechnol. 12:586-590(1994)に議論されている。

本発明はまた、本明細書に記載するように、セントロメア、ゲノム、および必要に応じてテロメアDNAを実質的に含む精製DNA分子を指向する。

1つの実施態様において、精製DNAは裸のDNAである。

別の実施態様において、精製された裸のDNAはDNAを凝縮する1以上の薬剤で凝縮される。トランスフェクションに前に精製DNAを縮合させて、剪断に対して安定化させることが有利であり得る。トランスフェクションに前に精製セントロメア(テロメア)およびゲノムDNAを凝縮させることによって、トランスフェクションの間の操作からの構造的損傷に対してより耐性とさせ得る。従って、本発明の1の実施態様において、精製セントロメア(テロメア)およびゲノムDNAを、トランスフェクションに前に1以上のDNA凝縮剤で凝縮させる。この点において、ポリカチオンは高分子量DNAを物理的に凝縮させ、そしてそれを機械的剪断から保

護することが示されている(Kovaicら, Nucleic Acids Res., 23:3999-4000(1995); WidomおよびBaldwin, J. Mol. Biol. 144:431-453(1980); WidomおよびBaldwin, Biopolymers 22:1595-1620(1983))。従って、さらなる実施態様において、精製DNAをポリカチオン化合物で凝縮させる。ポリカチオン化合物の例は、ポリリジン、ポリアルギニン、スベルミジン、スベルミン、およびヘキサアミンコバルトナトリウムを含む。

別の実施態様において、本発明は、タンパク質でDNAをプレコートすることを

含む。ヒストン、非ヒストン染色体タンパク質、テロメア結合タンパク質、および/またはセントロメア結合タンパク質のようなDNA結合タンパク質でDNAをプレコートするのが有利であり得る。このプレコートはいくつかの望ましい結果を有すると期待される。第1に、高分子量DNAを剪断から保護するであろうDNAの凝縮が生じる。第2に、DNAに結合することからヌクレアーゼを阻止することによって、トランスフェクトされたDNAのヌクレアーゼ分解を阻害する。第3に、上記に列挙された各タンパク質が核局所化シグナルを含有するので、プレコートされたDNAはトランスフェクションに続いてより効果的にDNAに侵入し得る。トランスフェクションの前にセントロメア（テロメア）DNAおよびゲノムDNAをDNA結合タンパク質でプレコートすることによって、本発明者らはトランスフェクションおよび合成染色体形成の効力が増大すると期待する。

従って、本発明の別の実施態様において、精製セントロメア（テロメア）DNAおよびゲノムDNAはトランスフェクションの前にDNA結合タンパク質でコートされる。DNA結合タンパク質の例はヒストン、非ヒストン染色体タンパク質、転写因子、セントロメア結合タンパク質、およびテロメア結合タンパク質を含む。

DNA結合タンパク質をまたDNAに対するそれらの親和性によって同定し、そして精製し得る。例えば、DNA結合はフィルターハイブリダイゼーション実験で明らかとなる。ここで、タンパク質（通常は、検出を容易とするために標識される）をフィルターに固定化したDNAに結合させるか、またはその逆も同様に、DNA結合部位（通常は標識される）を、固定されたタンパク質上のフィルターに結合させる。このような結合の配列特異性および親和性は、DNA保護アッセイおよびゲル遅延アッセイで明らかとされる。このようなタンパク質の精製は、配列特異的DN

Aアフィニティークロマトグラフィー技術（例えば、このドメインが結合するDNAで誘導体化した樹脂を有するカラムクロマトグラフィー）を利用して行い得る。DNA結合タンパク質のタンパク分解を用いて、DNA結合能力を保有するドメインを明らかにし得る。

従って、本発明は、哺乳動物細胞を本明細書中に記載される精製DNAでトランスフェクトするプロセス、およびこの細胞がインビボで完全にDNAを再構築する

ことを許容するプロセスによって生産された人工哺乳動物染色体を指向する。

従って、本発明は、哺乳動物細胞を精製された裸のDNAでトランスフェクトするプロセスによって生産された人工哺乳動物染色体に指向され、本明細書中に記載されるように、このDNAは実質的にセントロメアDNA（テロメアDNA）およびゲノムDNAを含む。

従って、本発明はまた、哺乳動物細胞を精製された凝縮DNAでトランスフェクトするプロセスによって生産された人工染色体に関し、本明細書中に記載されるように、このDNAは実質的にセントロメアDNA（テロメアDNA）およびゲノムDNAを含む。

従って、本発明はまた、精製されたコートDNAを哺乳動物細胞に導入するプロセスによって生産された人工哺乳動物染色体に関し、本明細書中に記載されるように、このDNAは実質的にセントロメア（テロメアDNA）およびゲノムDNAを含む。

本発明はまた、本明細書中に記載されるように、インビトロで精製ゲノムDNA（テロメアDNA）を組み合わせるプロセスによって作製された精製DNAに関する。

本発明はまた、本明細書中に記載されるように、インビトロで精製セントロメアDNA（テロメアDNA）とゲノムDNAを組み合わせるプロセスによって作製された、精製された凝縮DNAに関する。あるいは、個々のDNA成分を予め凝縮し、そして次いで、組み合わせ得る。

本発明はまた、本明細書中に記載されるように、インビトロで単離精製されたセントロメアDNA（テロメアDNA）とゲノムDNAを組み合わせるプロセス、およびDNA結合タンパク質を添加するプロセスによって作製された、精製されたコートDNAに関する。あるいは、個々のDNA成分をプレコートし、そして次いで、組み合わせ得る。

上述の精製DNAは、非連結セントロメア（テロメア）DNAおよびゲノムDNAよりなるものであり得る。あるいは、上述の精製DNAはまた、1以上のこれらのDNAが互いに連結されたセントロメア（テロメア）DNAおよびゲノムDNAよりなるものであり得る。

本発明はまた、上述の精製DNAを含む組成物に関する。この組成物は、DNAの細胞への侵入を容易にする成分を含み得る。人工染色体の形成のために、この組成物はDNAの哺乳動物細胞への取り込みを容易にし得る。あるいは、この組成物はDNAを含有するベクターの増殖のために使用される細胞へのDNAの取り込みを容易にする成分を含み得る。

本発明はまた、上述のDNAを含有するベクターに関する。このベクターはDNAを増殖するために、すなわち、哺乳動物細胞へそれらを導入するに前に上述の配列を増幅し、そして人工染色体を形成するために使用し得る。

従って、本発明はまた、上述のDNAを含有するベクターを含む組成物をに關し得る。

本発明はまた、上述のベクターを含有する細胞に関する。

本発明はまた、人工染色体を含有する哺乳動物細胞に関する。

本発明はまた、上述の精製DNAを含有する哺乳動物細胞に関する。

任意の哺乳動物細胞が本発明により包含されるが、本発明の好ましい実施態様において、この哺乳動物細胞はヒト細胞である。

本発明の好ましい実施態様において、セントロメアDNAはヒトアルファサテライトDNAである。しかし、アルファサテライトDNAは任意の霊長類に由来するものであり得ることが理解される。さらに、本発明は、非霊長類哺乳類由来のセントロメアDNAを含み、ここで、このセントロメアDNAは有糸分裂の間にCENP-Eと会合する。それが由来する生物とは無関係に、有糸分裂の間にCENP-Eと会合する任意のセントロメアDNA、および特に反復性DNAは、本発明の人工哺乳動物染色体のための機能的なセントロメア配列を提供することが期待される。従って、ヒト細胞で機能する人工哺乳動物染色体は、例えば、非ヒト哺乳動物からではなくヒト由来の、および鳥類のような非哺乳動物種からのセントロメア配列さえも含有し得る。CENP-Eと会合する任意の反復性DNAも潜在的に有用である。従って、本明細

書中に教示された方法に従って、任意のセントロメア配列を、哺乳動物人工染色体の成分としての機能について試験し得る。

本発明の特定の開示された実施態様において、セントロメアDNAはアルファサ



テライト整列の大きなストレッチ、反復テロメア配列(TTAGGG)<sub>n</sub>よりなるセグメント、および制限酵素NotIでの消化により産生されたランダムなゲノムフラグメントを含む。好ましい実施態様において、この制限酵素消化は、ヒトゲノムDNAのNotI消化によって生じたフラグメントの範囲の切片のDNA、好ましくは10kb〜3mbの範囲の切片のDNAを消化する。これは、BamHI、BglI、SalI、XhoI、NotI、SfiI、PmeIおよびAscIを含むが、これらに限定されない。

精製DNAを哺乳動物細胞に導入する場合、このDNAは機能的な合成または人工染色体を形成する。この染色体は天然に存在する哺乳動物染色体の特徴を有する。この染色体は低コピー数、通常細胞当たり1コピーで細胞に存在する。染色体は直鎖状であって、テロメア配列を含有する。CENP-Eは、有糸分裂の間に人工染色体と会合し、機能的なセントロメアの形成を示す。この染色体は選択の非存在下で有糸分裂的に安定である。染色体は検出不可能な取り込み頻度で、経時的に、構造的に安定である。染色体は1以上の転写的に活性な遺伝子を含有する。従って、これらの染色体は天然に存在する染色体に由来せず、インビトロで単離精製されたDNA配列から出発して構築される。

従って、本発明はまた、人工哺乳動物染色体を作製するための方法に関し、この方法は上述の哺乳動物細胞に精製DNAを導入することを含む。

このDNAを、当業者に公知の任意の多くの方法によって哺乳動物細胞に導入し得る。これらは、限定されるものではないが、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、DEAEデキストラン、リポソーム、レポーター媒介エンドサイトーシス、および粒子送達を含む。染色体またはDNAをまた用いて、卵、胚またはエキスピボもしくはインビトロ細胞にマイクロインジェクションし得る。当業者に公知の適切な導入技術を用いて、細胞を、染色体または本明細書中に記載されたDNAでトランスフェクトし得る。本発明の好ましい実施態様において、精製DNAの哺乳動物細胞への導入はリポフェクションによる。

従って、精製DNAは、哺乳動物細胞をトランスフェクトするのに有用であり、

このトランスフェクションの結果、トランスフェクトされたDNA由来の細胞中で人工染色体が形成される。

このDNAは、非哺乳動物細胞において別々に増殖し得るか、または1以上の成分を共に連結し得る。従って、本発明はまた、増殖のためのベクターに連結された精製DNAを指向する。このようなベクターは当業者に周知であり、pBac108L、P1、pACYC184、pUC19、pBR322、YACおよびコスミドを含むが、これらに限定されない。

本発明はまた、人工または合成染色体を含有する哺乳動物細胞に関する。本発明は任意の哺乳動物染色体または哺乳動物細胞に関する。全ての哺乳動物が含まれるが、好ましい実施態様はヒトである。従って、本発明の好ましい実施態様は、合成ヒト染色体を含有するヒト細胞を含む。

DNAおよび染色体は、特に、遺伝子治療および他の目的のための発現ベクターで使用するために開発された。従って、本発明の好ましい実施態様において、精製DNAは、実質的に、例えば、治療薬剤として、所望の遺伝子産物の発現に有用な1以上のDNA配列よりなる。従って、このDNAを人工染色体に含ませることによって、発現可能なDNAを細胞に導入する方法を指向する。DNAは調節し得、構造的であり得、遺伝子産物などとして発現され得る。好ましい実施態様において、DNAは遺伝子産物を提供する。哺乳動物細胞にトランスフェクトする場合、トランスフェクションに後に形成される人工染色体は、これらのDNA配列を保有し、そしてそれを発現する。

組換えDNA技術は、所望の生物学的物質の生産のために、過去20年間にわたって次第に増加して使用されてきた。種々の医学的に重要なヒト遺伝子産物をコードするDNA配列がクローニングされている。これらは、インスリン、プラスミノゲンアクチベーター、 $\alpha$ 1抗トリプシン、および凝固因子を含む。しかし、本発明は、任意のおよび全ての所望の医学的および／または生物学的に重要な遺伝子産物の発現を含む。

一旦細胞に入ると、異種遺伝子産物は機能的遺伝子産物を産生するレベルにて選択の組織で発現される。一般的なコンセンサスは、ほとんどのトランスフェクトされた遺伝子の正しい組織—特異的発現が達成可能なことである。正しい組織特異性のためには、細胞への導入および人工染色体の形成前に、目的のDNA配列

のクローニングで使用される全てのベクター配列を除去することが重要であり得る。従って、天然に存在する配列がそれらの天然に存在する配置で存在し、そして組織特異性が確保されるように、制御された様式で目的の異種遺伝子を人工染色体に導入し得る。

合成染色体をヒト幹細胞または骨髄細胞へ導入し得る。他の適用は当業者に明らかである。

ベクターを培養中の細胞または動物もしくはヒト患者の組織へ導入するための種々の方法が開発されている。ベクターを哺乳動物および他の動物細胞へ導入する方法は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン技術、マイクロインジェクション、リボソーム媒介技術、カチオン脂質ベース技術、ポリブレンを用いるトランスフェクション、プロトプラスト融合技術、エレクトロポレーション等を含む。これらの技術は当業者に周知であり、そして多くの容易に利用できる刊行物に記載され、そして広く総説されている。いくつかの技術が、Transcription and Translation, A Practical Approach, Hames, B.D. & Higgins, S.J. 編, IRL Press, Oxford(1984) (これはそれらの関連する教示のために、本明細書中に参考として援用される) に総説されており、Molecular Cloning, 第2版, Maniatisら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY(1989) (これはそれらの関連する教示のために、本明細書中に参考として援用される) に総説される。

発明の詳細な説明において、参照を、分子生物学の当業者に公知の種々の方法論のために作製した。参照を作製するためのこのような公知の方法論を記載する刊行物および他の資料を、関連する教示のために、本明細書中に参考として援用する。

組換えDNA技術の一般的原理を記載する標準的な参照は、Maniatis, T. ら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY(1989)である。

#### 定義

組換えDNA技術に関する全ての用語は、当該分野で認識される様式において使

用され、そして当業者に明らかである。

用語「Yアルファサテライト」および「Y $\alpha$ 」は、相互交換的に使用され、ヒトY染色体に由来するアルファサテライトDNAをいう。

用語「17アルファサテライト」および「17 $\alpha$ 」は、相互交換的に使用され、ヒト第17染色体に由来するアルファサテライトDNAをいう。

アルファサテライトDNAは、ヒト染色体に存在するタンデムな反復DNAであり、約170bpの基本的なモノマー反復を含む。この小反復は、ヒト染色体の1以上の群に対して特異的であることが示されている、高次単位に組織化される。

用語「セントロメア」は、凝縮され、そして減数分裂または有糸分裂の間の紡錘体の結合部位である、染色体の領域を意味する。減数分裂および有糸分裂の間に染色体の適切な分離が必要であり、従って、これは人工染色体の必須の成分である。セントロメアDNAは、セントロメア形成を指向するかまたは支持し、そしてそれにより、適当な染色体分離を可能とするDNAよりなる。免疫蛍光または免疫電子顕微鏡によって示されるような、活性で、機能的な、セントロメアにおけるセントロメアDNAは、有糸分裂の間にCENP-Eと会合する。「会合」とは、セントロメアDNAおよびCENP-EがFISHおよび免疫蛍光によって同時に局在化されることを意味する。

「必須染色体機能」は、明細書および上述の発明の背景で議論される。これらは、実験的な選択圧なくしての有糸分裂安定性、実質的に1:1の分離、自動複製、すなわちセントロメア、テロメア、および複製機能の起点を含む。

用語「機能的等価物」は、異なるDNAまたはタンパク質配列から生じるが、同一の生物学的機能を提供する遺伝子機能を示す。

用語「遺伝子産物」は、DNA、RNA、タンパク質またはペプチドを示す。

用語「ゲノムDNA」は、1以上のクローニングされたフラグメントまたは制限消化由来のフラグメントまたは配列および大きさの他の混合物、例えば、機械的に剪断されたDNA、またはインビトロで合成されたDNAを含む。DNAは、（例えば、クローニングされたフラグメントを使用した場合、または精製染色体由来のDNAを消化した場合のような）同一染色体、または（例えば、ゲノム制限消化をトランスフェクションのために使用した場合のような）異なる染色体に由来し得る。

用語「ゲノム」は、生物のゲノムで天然で見いだされるDNAをいう。しかし、本発明者らはまた、このゲノムDNAの機能が他の供給源、例えば、天然で見いだし得ない配列を有する合成DNA由来のDNAによってもたらされ得ることを認識する。従って、本明細書中で使用されるように、「ゲノム」DNAはまた、本明細書中に記載されるセントロメア（テロメア）DNAと共に細胞に導入されるDNAをいうために総括的に使用される。このDNAは遺伝子産物を発現するか、または遺伝子産物の発現を引き起こし、そして精製DNAを細胞中の内因性染色体へ取り込むことなく、細胞における精製DNAからの染色体形成を可能とする。従って、このDNAは、必要な発現可能配列および上述の機能を含む限り、合成または任意の生物に由来するものであり得る。

従って、セントロメアDNAに加えて、本発明に含まれる人工染色体は、遺伝子産物を発現し、または遺伝子産物の発現を引き起こし、細胞中の内因性染色体への精製DNAの取り込みなくして精製DNAからの染色体の形成を可能とするDNA配列を実質的に含有する。染色体機能（例えば、非取り込み）を提供するように機能し、配列を発現する配列は同一の配列であり得る。従って、発現可能な配列がまた他の機能を提供することは本発明の範囲内のものである。あるいは、染色体機能および発現機能を提供する配列は異なる発明であり得、そして異なる供給源に由来し得る。

特別に開示された実施態様において、ゲノムDNAはNotI制限消化に由来する。従って、好ましい実施態様において、内因性染色体への精製DNAの取り込みなくして精製DNAからの染色体の形成を可能とするDNAは、全ゲノムDNAをNotIの認識部位（8ヌクレオチド）を有する制限酵素で消化することによって生じた制限フラグメントに由来する。しかし、NotIおよび匹敵する酵素によって生じたものよりも小さい、天然に生じるゲノムDNAの制限フラグメントおよび他のフラグメントを用いることは、十分に本発明の範囲内である。例えば、本発明者らは、前期機能を維持している間にDNAの大きさを減少させることを考えている。従って、高度に好ましい実施態様において、このDNAは、目的の1以上の遺伝子の発現を提供するために、および内因性染色体への精製DNAの予めの取り込みなくして精製DNAからの染色体の形成を可能とする機能を提供するために必要なDNAのみを含有

するように削減する。

これらのDNAの供給源は同一である必要はない。従って、発現配列は1つの生物に由来し得、そして染色体機能を提供する配列は他の生物に由来し得る。さらに、1つのまたは両方の配列をインビトロで合成し得、そして天然に存在する配列に対応する必要はない。この点において、配列は厳格に「ゲノム性」である必要はない。配列に関する唯一の制限は、それらが前記の機能を提供することである。

用語「異種」は、細胞に人工的な哺乳動物染色体が導入される細胞において天然に存在するゲノムで見いだされないDNA配列を示す。あるいは、もし配列が見い出されるならば、さらなるコピーは「異種」であると考えられる。なぜならば、それらは天然に存在するゲノムで形成されるもので見い出されないからである。前記のように、異種DNAは、同時に所望の発現配列であって、「ゲノムDNA」であり得る。「発現可能」DNAは、それ自体発現され得ないが、別のDNA配列（異種または内因性）の発現を行うかまたは引き起こし得る。これは、DNAが例えば調節性である場合である。

「高次反復」とは、それ自体がより小さい（モノマー）反復単位からなる反復単位を意味する。アルファサテライト整列の基本的組織単位は、約171bpのアルフォイドモノマーである。モノマーは、染色体特異的な高次の反復単位に組織化され、これはまた、タンデム反復的である。所与の高次反復における構成モノマーの数は、2（例えば、ヒト染色体1において）から30（ヒトY染色体）を超えるまで変化する。構成モノマーは、約60%から実質的に配列同一性まで相互に種々の程度の相同性を呈する。しかしながら、高次反復は、ほとんどの所与のアルフォイド整列を通じて高度の相同性を保有する。

用語「哺乳動物染色体」は、哺乳動物細胞において染色体として機能するDNA分子またはゲノム単位を意味する。

用語「裸のDNA」は、通常は天然に存在する染色体と会合する生物学的（染色体または細胞）成分、例えば、ヒストン、非ヒストン染色体タンパク質、RNA、転写因子、トポイソメラーゼ、スカフォールド（scaffold）タンパク質、セントロメア結合性タンパク質、およびテロメア結合性タンパク質のいずれとも会合し

ないDNAを意味する。このようなDNAは、細胞から単離され、非DNA染色体成分か

ら精製され得る。あるいは、このDNAはインビトロで合成することができる。

「天然に存在する」なる用語は、天然で存在し、実験的に誘導されない事象を示す。

複製起点は、DNA合成の開始の部位を示す。

用語「単離された」は、細胞から取り出されたDNAをいう。用語「精製された」は、細胞の非DNA成分から実質的に完全に分離された単離DNA、またはインビトロで合成され、そしてDNAからの染色体の構築を干渉する、合成に使用される物質から実質的に完全に分離されたDNAをいう。精製DNAはまた、天然で会合するDNA配列から単離されたDNA配列であり得る。

レプリコンは、DNAが複製され、そして定義により複製起点を含有するゲノムのセグメントである。

語句「天然の哺乳動物染色体の全ての機能を保有する」は、染色体が、実験的な選択圧の非存在下で、組み込まれない構築体として哺乳動物細胞の分裂において安定に維持されることを意味し、少なくともセントロメア、テロメア（直鎖状染色体について）の、複製機能の起点、および遺伝子発現を示す。

用語「有糸分裂的に安定」は、合成または人工の染色体が、（薬剤選択等のような）実験的選択圧の非存在下における10世代後の細胞の少なくとも50%において存在すること、最も好ましくは、30世代の後、それが細胞の少なくとも10%において存在すること；好ましくは、合成染色体が時間の99%を超えて1：1分離を呈することを示す。

「安定に形質転換された」とは、反復単位を含有するクローニングされたDNA整列が、（174kb整列で）世代当たり0.6%未満の組換え頻度、および（130kbで）0.2%未満の組換え頻度で、少なくとも50世代の増殖の間、微生物宿主細胞で増殖され得ることを意味する。130kbより小さい整列は、本発明の方法によってクローニングした場合に組換えをほとんどまたは全く呈しない。

用語、「合成」または「人工」を、交換的に使用する。「合成」または「人工染色体」は、必須の染色体機能を有する構築物であるが、天然に存在しない。そ

これは、精製DNAを細胞に導入することによって作製される。染色体は全体的にトランスフェクトされたDNAよりなるので、合成または人工といわれる。人工また

は合成の染色体は、天然に存在しない立体配置であることが判明した。

用語「トランスフェクトする」は、核酸の細胞への導入を示す。このように導入された核酸は、導入された配列、物理的立体配置、またはコピー数において、細胞内で、天然ではない。

テロメアは、テロメラーゼと呼ばれるリボ核タンパク質酵素によって合成される単純な反復DNAを含む染色体の末端を示す。その機能は、直鎖状DNA分子の末端を複製することである。

分子がポリペプチドをコードする配列、および適切な宿主環境にて、タンパク質産物においてDNAに含有される遺伝情報を転写、プロセッシングおよび翻訳する能力を提供する発現制御配列を含有する場合、およびこのような発現の制御配列がポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結される場合、DNAまたは遺伝子のような核酸分子はポリペプチドまたは遺伝子産物を発現する。しかしながら、本明細書に記載するように、遺伝子産物は、ポリペプチド遺伝子産物に限定される必要はなく、RNAを含み得る。さらに、発現ベクターとして使用した場合に人工的な哺乳動物染色体によって修正され得る遺伝子欠陥は、遺伝子発現をさらに行うようにシスにて働く欠陥であり得る。

作動可能な連結は、調節DNA配列および発現されることを望むDNA配列が遺伝子発現を可能にするような方法で結合される連結である。遺伝子発現に必要な調節領域の正確な性質は生物間で変化するが、一般には、プロモーター領域、TATAボックス、CAP配列、CAAT配列等のような転写および翻訳の開始に関与する5'非コード配列を含む。所望ならば、タンパク質をコードする遺伝子配列の3'側の非コード領域は前記の方法によって得ることができる。この領域は、停止およびポリアダニル化のようなその転写停止調節領域のために保持され得る。従って、天然では、タンパク質をコードするDNA配列に隣接する3'領域を保持することによって、転写停止シグナルを提供し得る。転写停止シグナルが発現宿主細胞で満足よくように機能しない場合、宿主細胞における3'領域は置換され得る。



以下の実施例は、本発明を記載する実施態様に限定するものではなく、発明が実施され得る特定の方法を具体的に記載するために提示する。

## 実施例

### 実施例 1

#### 第17染色体アルファサテライトベクターの構築

BACベクターを用いて、E. coliにおけるアルファサテライトDNAをクローニングし増殖させるために、種々のサイズの一連のタンデムアルファサテライト整列を構築した。

ヒト第17染色体からの高次のアルファサテライト反復の構造は従来に記載されている (WayeおよびWillard, Mol. Cell. Biol. 6(9):3156-3165(1986))。ヒト第17染色体の支配的な高次反復は、長さが2.7kbであり、EcoRI部位に隣接した16のアルフォイドモノマーからなる。ヒト第17染色体またはヒトY染色体に由来するアルファ・サテライトDNAの区別される構造単位、高次反復を、ヒトゲノムDNAを制限酵素EcoRIで消化することによってプラスミドクローニングベクターpACYC184 (New England Biolabs) にクローニングした。クローニングされた高次反復のヌクレオチド配列をDNA配列分析によって確認した。

ポリメラーゼ鎖反応 (PCR) を用いて、相補的な制限部位 (BamHIおよびBglII) が高次レジスターの反対の末端で作製されるように、単一の2.7kb高次反復モノマーを増幅した。高次反復の正確な長さは維持された。このフラグメントを増幅するのに使用したプライマー対は

VB100-5' ... gggcgggagatctcagaaaattctttgggatgattgagttg (配列番号 2)、  
および

VB101-5' ... gggcgggatcccttctgtcttctttttataggaagttattt (配列番号 3) であった。

増幅フラグメントをBamHIで消化し、挿入DNAをゲル精製し、そして予めBamHIおよびHpaIで消化しゲル精製したベクターDNAに連結することによって、改変された高次反復をBACベクターpBAC108L (Bruce Birren, California Institute of Technology, Pasadena, CAからの贈物) にクローニングした。得られたプラス

ミドをpBAC-17 $\alpha$ 1とした。

アルファサテライトDNAの合成ダイマーを構築するために、pBAC-17 $\alpha$ 1のアリコートを、別々に、(1) BamHI+SfiIまたは(2) BglII+SfiIのいずれかで消化

した。ゲル電気泳動後、BglII/SfiI消化物由来の2.7kbアルファサテライトバンドを切り出し、切り出したpBAC-17 $\alpha$ 1 BamHI/SfiIフラグメントに連結した。BglIIおよびBamHIは適合性の突出を生じるので、SfiIは非対称突出を生じ、これは特定の向きで、2.7kbフラグメントをベクターDNAに連結し得るのみで、頭-尾様式で配置したタンデムダイマーを生じる。連結産物を、エレクトロポレーションによって細菌株DH10Bに形質転換した。制限分析によってクローンを分析し、第17染色体アルファサテライトのタンデム配置の改変ダイマーを含有するものをpBAC-17 $\alpha$ 2と命名した(図1)。このストラテジーを繰り返し、4、8、16、32、48または64の高次のアルファサテライト反復からなる延長されたアルファサテライト整列を作製した。同様の戦略を利用して、Y染色体のような他のヒト染色体からの高次反復の合成整列を構築した。

174kbのアルファサテライトDNAを含有するBACベクターの構築は、現在までにE. coliでクローニングされ、増殖されるDNAのこのクラスの最大量を表す。従来の実験は、コスミドを用い、E. coliで約40kbを成功裏にクローニングしている(Willardら, Prog. Clin. Biol. Res. 318:9-18(1989))。他のものは、中程度のコピー数のプラスミドを用いて、約171bpアルフォイドモノマーから40kbのサイズ範囲の整列をクローニングした(WayeおよびWillard, Nucleic Acids Res. 15(18):7549-69(1987))。当該分野で報告されている研究において、E. coliにおける増殖の間の高頻度の組換えが、最大のアルフォイド整列を含有するプラスミドで観察された。対照的に、pBAC-17 $\alpha$ 64の増殖の間に、プラスミド精製の標準的な方法を利用して、組換え産物が観察された証拠はほとんどない。微生物におけるアルファサテライトDNAの構造的な不安定性がこれらのクローニングベクターの環境で示されているので、pBAC-17 $\alpha$ 64の増殖を、ゲル電気泳動を利用して、明らかに再配置された整列の存在について分析した。このアッセイによって、再配置プラスミドの有意なレベルの存在は検出できなかった。

## 実施例 2

### E. coliにおけるクローニングされた反復性DNAの安定性のアッセイ

E. coliでの増殖に続いて、実施例 1 からの合成アルファサテライト整列におけ

る高レベルの組換えおよび／または欠失が観察された証拠はないが、比較的高レベルで組換えが起こる可能性があった。しかし、多数の異なる欠失産物は、いずれか 1 つの産物の検出を妨げた。従って、高感度アッセイを利用するこれらの構築物の組換え率を決定した。さらに、より大きな整列は、より小さいものよりも安定が低いと予測されるので、いくつかの異なるサイズの構築物を調べた。これらの構築物の安定性を以下で調べた。

安定性アッセイを、pBAC108Lにクローニングされている 3 つの異なるアルファサテライト整列サイズを用いて行った。これらの構築物、pBAC-17 $\alpha$ 32、pBAC-17 $\alpha$ 48、およびpBAC-17 $\alpha$ 64は、各々、アルファサテライトDNAの87kb、130kbおよび174kbを含有する。E. coli株DH10B (GIBCO BRL) への形質転換 (エレクトロポレーション) に続き、単一クローンを拾い、分析した。組換えプロセス自体はDNA再配置に導き得る可能性があるため、制限消化および電気泳動により判断されるように、全長の構築物を圧倒的に含有する唯一のクローンをグリセロールストックとして保存した。

安定性アッセイを開始するために、各構築物のグリセロールストックからのE. coli細胞を、12.5  $\mu$ g/mlクロラムフェニコールを含有するLBプレートに画線培養した。得られたコロニーの 8 個を拾い、12.5  $\mu$ g/mlクロラムフェニコールを含有する 5 mlのLBに飽和するまで個々に増殖させた (約20世代)。次いで、各クローンからのプラスミドDNAを精製し、BamHIで消化し、パルスフィールドゲル電気泳動によって分離した。いずれかの全長プラスミドを含有するクローンは、単一細胞の段階で全長プラスミドを有すると言われた。いずれかの検出可能な全長プラスミドを含有しないクローンは、再画線培養に先立って組換え事象の結果であると言われ (すなわち、グリセロールストックの生成の間に起こった再配置)、そしてこれを排除した。いくつかの全長プラスミドを含有するクローンのうち、10 個の培養物をランダムに拾い、12.5  $\mu$ g/mlクロラムフェニコールを含有する新鮮

LBに1/100万に希釈し、飽和するまで増殖させた（約30世代）。単一細胞からこの最終飽和培養物まで、約50世代の増殖が起こった。

これらの50世代の間に再配置したプラスミドのパーセントを測定するために、各飽和培養物を、12.5 µg/mlクロラムフェニコールを含有するLBプレートに画線

培養した。次いで、個々のコロニーを、12.5 µg/mlクロラムフェニコールを含有する1.5ml LB中で飽和するまで増殖させた。増殖後、DNAを精製し、そして制限消化（BamHI）およびPFGEによって分析した。検出可能な全長プラスミドを含有する任意のクローンを、50世代の実験の間に再配置しないとスコア取りした。逆に、いずれかの検出可能な全長プラスミドを含有しない任意のクローンを、50世代の実験の間に再配置したとスコア取りした。各構築物について世代当たりの平均再配置頻度を計算するために、再配置クローンの分率を50世代後に決定した。1からこの値を引いたものは、（50世代後の）非再配置クローンの分率に等しい。1世代後に再配置したクローンの分率は、1から50世代後の非再配置クローンの分率の50乗根を引いたものである。これは以下の式で要約される：

$$X = 1 - (1 - Y)^{1/50}$$

〔Xは世代当たりの再配置するクローンの分率であって、Yは50世代の増殖後の再配置クローンの分率である〕。

このストラテジーを用い、3つのアルファサテライト含有構築物の組換え頻度を決定した。50世代の増殖の後、pBAC-17 α 32クローンの0%が切形形態に組み換えられた。組換え物を、各々、8.5%（n=59）および25%（n=84）のレベルでpBAC-17 α 48およびpBAC-17 α 64について検出した。これは、pBAC-17 α 48について0.18%、pBAC-17 α 64について0.57%の世代当たりの組換え頻度に相当した。従って、この組換え頻度は、はるかに低いアルファイドDNA（例えば、40kb）を含有し、そしてより少数の世代（例えば、30世代）の間、増殖させた他のクローニングベクターについて報告されたものよりも有意に低かった。

結果は、サイズが少なくとも174kbまでのアルファサテライト整列が、本発明の方法においてBACベクターを用いて、E. coliにおいて安定に増殖され得ることを示す。174kbおよび130kbの整列は、各々、世代当たり0.57%および0.18%の頻

度で組換えられた。従って、例としてpBAC-17 $\alpha$ 64を用いて、単一細胞からの50世代の増殖後に、約1,000力価の飽和細菌培養物を単一細胞から生成させることができ、そして平均して、少なくとも75%の細胞は、全長pBAC-17 $\alpha$ 64を含有する。この程度の再配置は、遺伝子治療で用いるアルファサテライト含有ヒト人工染色体の大規模な生産のための予測される許容範囲内にある。

pBAC108LにおけるアルファサテライトDNA再配置の頻度を測定するに加えて、このベクターにおける、高度に反復性のアルファサテライト整列のサイズとその安定性との間の相関が確立された。前記決定の組換え頻度に基づき、BACベクターにおける同種アルファサテライトDNAの最小上方サイズ限界の見積もり（50世代後に50%の全長クローンは許容されると仮定する）は、200および215kbの間であると控えめに見積もられた（図2）。これは、コンピュータープログラムCriket Graphを用いて外挿によって決定した。データにフィットし、そして前記の見積もりよりも大きな見積もりを生じる他の系が見出されるので、これはアルフォイド能力の最小見積もりである。この相関から、200~215kb整列および細菌株DB10Bにおける増殖を用いる場合、50%を超えるプラスミドが50世代後に全長であると見積もられる。この上方サイズの数字は、特殊化された組換え欠損細菌株と組み合わせて、BACベクターを利用することによって延長され得る。さらに、この見積もりは、最大に同種の整列に基づく。特定の天然アルファサテライト整列を含む種々の整列の安定性は、この見積もりを超えるはずである。

本明細書に記載する実験は、E. coliにおける50kbよりも大きいアルファサテライト整列の最初の安定なクローニングおよび増殖を表す。従来には、アルファサテライトDNAは、コスミドを用いて、E. coliでクローニングされている(Haafら, Cell 70(4):681-96(1992))。これらの整列の比較的小さいサイズ（40kbと同等かまたはそれ未満）に加えて、これらの整列の一体性および安定性は分析されなかった。アルファサテライトDNAはまた、YACを用いてクローニングされている(Neilら, Nucleic Acids Res. 18(6):1421-8(1990))。これらの研究において、アルファサテライト整列の不安定性が注目されており、そしてアガロースゲル精製のようなさらなる操作が、全長整列を主に含有する調製物を得るのに必要であった

。さらに、アルファサテライトDNAを増殖させるためにYACを用いるある種の不利がある。恐らくは、これらのうち最も重要なものは、YACのトポロジーに関する。一般に、YACは直鎖状DNA分子であり、従って、単純なアルカリ溶解精製法を用いて、汚染酵母の染色体からアルファサテライト構築物を精製することはできない。その代わり、パルスドフィールドゲル電気泳動、スケールアップできない分離方法を用いなければならない。最後に、YACの直鎖状トポロジーは、精製

の間、それらを剪断に対して特に感受性にする。ここに、アルファサテライト含有BACを集め、そして実質的な剪断を伴うことなく、E. coli染色体DNAから精製し得ることが示された。

従来の研究は、アルファサテライトDNAが機能的なヒトセントロメアの重要な成分であることを示唆する。天然に存在するアルファサテライト整列は、長さが230kbから数メガベースのサイズで変化する (OakleyおよびTyler, Genomics 7(3): 325-30(1990)) ; (WevrickおよびWillard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA86(23):9394-8(1989))。しかしながら、最近の研究は、140kbもの小さいアルファサテライトDNAがヒト細胞においてセントロメア機能を付与するのに十分であることを示唆する (Brownら, Human Molecular Genetics 3(8):1227-1237(1994))。本明細書に記載するアルファサテライト整列は、機能的ヒトセントロメアのアルファサテライト要件を満足するのに十分に大きさであるアルファサテライト整列の大規模で安定な生産を可能とする最初のものである。これらの構築物は合成ヒト染色体の骨格として作用し得る。

#### 実施例 3

##### Y染色体アルファサテライトベクターの構築

ヒト男性Y染色体細胞株GM07033由来のDNAを用いる以外は、構築は実施例 1 と同様であった：正常男性細胞株由来DNAは、いずれも同等である。ヒトY染色体についての支配的な高次アルフォイド反復は、長さが5.7kbであり、隣接するEcoRI部位によって区別される。Y染色体アルフォイド整列からの5.7kbの高次反復を、標準的なE. coliクローニングベクターpACYC184 (New England Biolabs) にクローニングした。次いで、PCRを用いて高次反復の末端を改変して、一方の末

端にBamHI部位および他の末端にBglII部位を作製し、存在するEcoRI部位を置き換えた。改変された高次反復を、前記のようにpBAC108Lクローニングベクターにクローニングした。

#### 実施例 4

##### ハイブリッドアルファサテライトベクターの構築

ヒト第17染色体およびヒトY染色体の双方由来のアルフォイドDNAを用いる以外は、構築は実施例1と同様であった。2つのタイプの整列を構築した。一方の整列は単純な交互反復であり、ここで、第17染色体のアルフォイドDNAの1つの高次反復単位は、Y染色体アルフォイドDNAからの1つの高次反復単位と交差した。構築した第2のタイプの整列は、アルフォイドDNAの第17染色体の高次反復のダイマー単位とアルフォイドDNAのY染色体反復の1つの単位とを交互にした。それぞれの場合において、前記の例を用いるのと同様に、各染色体に由来する高次反復の正しい位相性は合成ハイブリッドの接合で保持された。

#### 実施例 5

##### 人工的な哺乳動物染色体の構築

##### 実験手法

##### DNA構築物の記載

標準的な分子生物学技術を用いて、明細書に記載する全てのプラスミドを構築した(Sambrook, J.ら編, 『Molecular Cloning』, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989))。Y染色体および第17染色体からのアルファサテライト高次反復のクローニングは従来に記載されている(Wolfe, J.ら, J. Mol. Biol. 182:477-485(1985); Van Bokkelen, G. B.ら, 『Method for Stably Cloning Large Repeating Units of DNA』, 米国特許出願(1995); Waye & Willard, Mol. Cell. Biol. 6:3156-65(1986))。適切な制限部位の作製を介する方向性クローニングによって、順次、より大きなアルファサテライト整列がプラスミドpBAC108Lで作製されている(反復性配列の大きなタンデム整列のクローニングの教示について、参考として本明細書中に援用されるVan Bokkelen, G. B.ら, 『Method for Stably Cloning Large Repeating Units of DNA』, 1995年6月7日出願の米国特許出願第08

／487, 989号)。

実験で使ったプラスミド

pBAC108Lは、従来に記載されている (Shizuya, H. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8794-7(1992))。pVJ105は、ポリリンカー中のさらなる制限部位、な

らびにCMV即時型遺伝子プロモーターとSV40ポリアデニル化シグナル(Seed, B., Nature 329:840-2(1987); Seed & Aruffo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3365-9(1987)),  $\beta$ -geoオープンリーディングフレーム(MacGregor, G.R. ら, Development 121:1487-96(1995))、およびUMS転写停止配列(Heard, J.M. ら, Mol. Cell Biol. 7:2425-34(1987); McGeady, M.L. ら, DNA 5:289-98(1986); Salier & Kurachi, Biotechniques 7:30-1(1989))とからなる $\beta$ -geo発現単位を含有するpBAC108Lの改変体である。pBAC $\alpha$ 16 (92kbのYアルファサテライト)は、pBAC108L内にヘッダーテイルでクローニングされた16個の同一の高次反復からなる。pBAC17 $\alpha$ 32 (87kbの17アルファサテライト)は、ヘッダーテイルでpBAC108L内にクローニングされた32個の同一の高次反復からなる。pVJ105-Y $\alpha$ 16を、pBAC108Lからのアルファサテライト整列をpVJ105にクローニングすることにより作製した。BamHIおよびSfiIでの直鎖状化に続き、 $\beta$ -geo発現の方向はアルファサテライト整列に向かう。pVJ105-17 $\alpha$ 32を、pBAC17 $\alpha$ 32からのアルファサテライト整列をpVJ105にクローニングすることにより作製した。前記の直鎖状化に続き、 $\beta$ -geo転写の方向はアルファサテライト整列に向かう。全てのプラスミドをアルカリ溶解 (Sambrook, J. ら編, [Molecular Cloning], Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)) によって精製し、その後、アガロースゲル精製した。

多量体化による>100kbアルファサテライト整列の作製

Yアルファサテライト整列を作製するために、pVJ105 Y $\alpha$ 16をBamHIおよびSfiIで消化し、パルスドフィールドゲル電気泳動 (PFGE) によってゲル精製した。pBAC $\alpha$ 16をBamHIおよびBglIIIで消化し、前記のPFGEにより92kbのアルファサテライトフラグメントをゲル精製することによって、さらなるアルファサテライトDNAを調製した。バンドの単離後、アガロースバンドを、10mM Tris (pH7.5)、100mM NaCl、10mM MgCl<sub>2</sub>中で平衡化させ、次いで、65℃で5分間融解した。次





超えるテロメアDNAを精製した。このDNAをゲルから切り出し、製造業者 (Promega, WI) の指示に従って Magic Prep カラムを用いてアガロースから精製した。

#### ヒト細胞のトランスフェクション

トランスフェクションに先立ち、pVJ105 Y $\alpha$ 16 および pVJ105 17 $\alpha$ 32 を BamHI および SfiI で消化し；pBac Y $\alpha$ 16 および pBac Y $\alpha$ 32 を BamHI および BglII で消化した。次いで、PFGE によって DNA を精製し、10mM Tris (pH7.5)、100mM NaCl に対して平衡化し、そしてテロメア DNA および／または NotI 消化のヒトゲノム DNA を合わせた。いくつかの場合、アルファサテライト整列を、図3に記載した方向性連結アプローチを用いて延長させた。

各トランスフェクションについての DNA 成分を合わせ、穏やかに混合した。トランスフェクションは、pVJ105 Y $\alpha$ 16 (0.5~1 $\mu$ g)、pVJ105 17 $\alpha$ 32 (0.5~1 $\mu$ g)、または pVJ105 VK75 (0.5~1 $\mu$ g) を含有した。示す場合、トランスフェクションはまた、精製された Y $\alpha$ 16 整列 (0.5~1 $\mu$ g)、17 $\alpha$ 32 整列 (0.5~1 $\mu$ g) テロメア DNA (75~250ng)、ヒトゲノム DNA (1~3 $\mu$ g) および／または VK75 フラグメント (0.5~2 $\mu$ g) を含有した。1ml の無血清  $\alpha$ -MEM 培地 (Media Tech) を添加した。次いで、7.5 $\mu$ l のリポフェクチンを添加し、溶液を室温で5分間インキュベートした。DNA：リポフェクチン混合物を、製造業者 (Gibco BRL) の指示に従って、 $2 \times 10^6$  の HT1080 細胞に添加した。16時間の37℃でのインキュベーションの後、DNA：リポフェクチン溶液を取り出し、そして完全培地を細胞に添加した。トランスフェクションの36時間後、細胞をトリプシン/EDTAを用いてウェルから取り出し、300 $\mu$ g/ml G418を補充した完全培地を含有する100mmプレートに移した。選択の第7日に、培地を、300 $\mu$ g/ml G418を補充した新鮮な完全培地と取り替えた。選択の12日後、個々のコロニーを滅菌クローニングリングを用いて単離し、24ウェルプレートに置いた。次いで、各トランスフェクションからの個々のクローンを、選択下で100mmプレートに拡大した。各培養の一部をさらなる分析のために凍結し、他方、大部分をFISHによる分析のために集めた。

#### 細胞培養

HT1080細胞を、15%ウシ胎児血清 (Hyclone)、ペニシリン/ストレプトマイシ

ン、およびゲンタマイシンを補充した $\alpha$ MEM培地(Gibco/BRL, Bethesda, MD)中で増殖させた。本実験で用いたHT1080のサブクローンは、テトラプロイドであった。

#### プレート染色

合成染色体を含有する細胞を、10%コンフルエンスで6ウェルプレート中で平板培養した。トランスフェクトしていないHT1080細胞を、同様に平板培養し、陰性コントロールとして使用した。細胞が70%コンフルエンスに到達すると、培地を取り出し、そして細胞を2ml PBSで洗浄した。PBSを除いた後、1mlの固定溶液(PBS中、2%ホルムアルデヒド、0.2%グルタルアルデヒド)を各ウェルに添加し、そしてプレートを室温で4分間インキュベートした。固定溶液を除き、細胞を2ml PBSで直ちに洗浄した。最後に、PBS洗液を除き、1mlの染色溶液(PBS中、5mMフェリシアン酸カリウム、5mMフェロシアン酸カリウム、5mM  $MgCl_2$ 、および1  $\mu g/\mu l$  X-Gal)を各ウェルに添加し、そしてプレートを12時間37℃でインキュベートした。細胞をPBSで洗浄し、そして光学顕微鏡および組み合わせた画像化装置(Oncor, Gaithersburg, MD)を用いて画像化した。

#### 蛍光インサイチュハイブリダイゼーション

HT1080を100mm組織培養プレートで増殖させ、FISHのために集め、公表された手法(Verma, R & Babu, A., Human Chromosomes, Principles and Techniques, 第2版, McGraw-Hill, Inc. (1995))に従い、スライド上に固定した。合成染色体および内因性染色体上のアルファサテライト配列を検出するために、染色体特異的アルファサテライトプローブを、製造業者(Oncor, Gaithersburg, MD)の指示に従って使用した。

合成染色体を含有するクローンにおける合成YアルファサテライトDNA内容物の測定

ゲノムDNAを、公表された手法(Sambrook, J.ら編, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harnor, NY(1989))に従い、HT1080細胞およびクローン22-6、22-7、22-11、22-13、および23-1から集めた。次いで、各クローンからの約10  $\mu g$  DNAを、EcoRI (50単位) およびPstI (50単位)

を用いて、37℃で一晩消化した。次いで、サンプルを、0.8%アガロースゲ

ルを介して電気泳動を行い、Nytran膜に移し、そして25%ホルムアミド/10%デキストラン/0.5% SDS/0.5M NaCl/200 µg/mlサケ精子DNA中で、65℃で一晩、1 kb Yアルファサテライトプローブにハイブリダイズさせた。EcoRIおよびPstIは共に、内因性Yアルファサテライト高次反復を一回切断して、4kbおよび1.7 kbのバンドを与えた。しかしながら、合成Yアルファサテライト整列を生じるために使用した方法のため、EcoRIは合成高次反復を切断しない。その結果、合成整列のEcoRIおよびPstIの消化により、5.7kbバンドが得られる。本発明者らは、内因性Yアルファサテライト整列が1 mbの長さであることを知っているため、本発明者らは、4.0kbバンド（内因性整列）に対する5.7kbバンド（合成整列）の比を決定することによって、合成染色体を含有する細胞中の合成アルファサテライトDNAの量を測定し得る。1.7kbバンドは考慮する必要がない。なぜなら、それは、これらのハイブリダイゼーション条件下でプローブとハイブリダイズしないからである。しかしながら、これらのクローンのほとんどが、2つのY染色体（なぜならば、それらはテトラプロイドだからである）およびただ1つの合成染色体を含有することを考慮するのは重要である。これに対する1つの例外は、1つのY染色体を含有し、そしてジプロイドのようであるクローン22-13である。従って、クローン22-6、22-7、および22-11については、細胞当たりの合成アルファサテライトDNAは、以下の式により評価される：

$$\frac{\text{5.7kbバンドの強度}}{\text{4kbバンドの強度}} \times 1 \text{ mb} \times 2$$

クローン22-13については、以下の式を用いた：

$$\frac{\text{5.7kbバンドの強度}}{\text{4kbバンドの強度}} \times 1 \text{ mb}$$

#### 免疫蛍光

抗-CEN免疫蛍光は公表された手法(Sullivan & Schwartz, Hum. Mol. Genet.

4:2189-2197(1995))に従って行った。略言すれば、HT1080細胞をほぼ80%コン

フルエンスまで組織培養プレート中で増殖させた。次いで、コルセミドを40ng/mlの最終濃度まで添加し、細胞を37℃で75分インキュベートした。培地を注意深く取り出し、3~5分間のトリプシン/EDTAでのインキュベーションによって細胞をプレートから遊離させた。トリプシンを中和するために、完全な培地を細胞に添加し、得られた細胞懸濁液を血球計を用いて計数し、Jouan CT422遠心機にて1000rpmで回転させた。上清を捨て、低張溶液(25mM KCl、0.27%クエン酸ナトリウム)をゆっくりと添加することによって、細胞を $0.6 \times 10^5$ 細胞/mlで懸濁させた。細胞を室温にて12分間、低張溶液中でインキュベートした。次いで、500  $\mu$ lを細胞漏斗(cytofunnel)に添加し、Shandon Cytospli 3遠心機中、1900 rpmにて10分間回転させた。次いで、スライドを10mM トリス pH7.7、120mM KCl、20mM NaCl、0.1%トリトンX-100中で12分間インキュベートした。希釈した抗体(50  $\mu$ l、1mM トリエタノールアミン、25mM NaCl、0.2mM EDTA、0.5%トリトンX-100、0.1%BSA中1/1000)を各スライドに添加し、プラスチック製カバーガラスを細胞の上に置いた。37℃での30分間のインキュベーションの後、カバーガラスを外し、KB(10mM トリス pH7.7、150mM NaCl、0.1%BSA)を含有するCoplínジャー中でスライドを3×2分洗浄した。FITC-標識抗ウサギIgを添加し(KB中1/100の50  $\mu$ l)、プラスチック製カバーガラスを細胞上に置いた。37℃における30分間のインキュベーションの後、スライドをKBを含有するCoplínジャー中、3×2分洗浄した。観察する前に、スライドをDAPI 10  $\mu$ l(アンティフェイド中2  $\mu$ g/ml)で逆染色した。蛍光顕微鏡および画像システム(Oncor, Gaithersburg, MD)を用いて画像を収集した。

#### 有糸分裂安定性経過

クローニングに続き、細胞を2つの100mmプレートに拡大し、300  $\mu$ g/ml G418の存在下で増殖させた。80%コンフルエンスにおいて、各クローンにつき1つのプレートを、前記したプロトコルを用いてFISH分析のために収穫した。これらの細胞は時間経過の0時点として働く。他のプレートを1/16を100mmプレートに分け、G418を欠く完全培地中でコンフルエンスまで増殖させた。培養がコンフルエン

スに到達するや否や、細胞を1/16に分け、G418を欠く完全培地で増殖させた。  
こ

のプロセスを表2に示したサイクルで繰り返した。種々の時点で、培養物の一部をFISHのために収穫し、トランスフェクトしたアルファサテライト (17 $\alpha$ またはY $\alpha$ ) の存在につき分析した。延ばした各無傷染色体につき、Yアルファサテライト (または17アルファサテライト) シグナルの数および染色体位置を測定した。

#### 結果

哺乳動物セントロメアは、アルファサテライトと呼ばれる反復性DNAの大きなブロックよりなると考えられる完全な染色体エレメントである。哺乳動物セントロメア構造の解明を阻害し、人工ヒト染色体の開発を防止する主要障害の1つはDNAのこのクラスの大きなセグメントをクローニングできないことであつた。最近、長さがほぼ175kbまでのアルファサテライトDNAのクローニング方法および大規模生産が開発されている (Van Bokkelen, G.B. ら, 表題 'Method for Stably Cloning Large Repeating Units or DNA', 1995年6月7日出願の米国特許出願第08/487,989号)。同様に重要なことには、方向性クローニング戦略の使用は、公知の組成物および構造のある種のアルファサテライト整列を可能にする。

裸のトランスフェクトされたアルファサテライトDNAからの機能性セントロメアの形成を容易にするために、本発明者らは、サイズが175kbを超えるアルファサテライトDNAをトランスフェクトするのが有利であろうと仮定した。従来には、哺乳動物細胞にトランスフェクトすべき最大近接アルファサテライト整列は120kbであつた (Larin, Z. ら, Hum. Mol. Genet. 3:689-95(1994))。175kbより大きいアルファサテライトDNAを生産するには、図3Aに示す方向性連結ストラテジーを使用した。このインビトロ技術は、隣接する中断されていない長さが736kbまでのYアルファサテライト整列の生産を可能にする (図3B、レーン2-4)。対照として、VK75 (75kb Bss HIIフラグメント) をBssHIIの存在下および非存在下で連結した (図3B、レーン5-7)。BssHII末端は、連結した場合に、BssHII部位を生じ、BssHIIが連結反応に含まれる場合、マルチマーのラダーを構成モノマ

一まで消化する。同様の結果が、BamHIフラグメントまたはBglIIフラグメントを用いて行う実験で得られた（データは示さず）。これは、再切断反応が十分であり、レーン2および3のラダーが頭一尾連結の結果であることを示す。最後に、ア

ルファサテライトDNAの別々のファミリーの間の生物学的差異につきテストするため、第17染色体に由来するアルファサテライトDNAよりなる延長された整列も形成された（データは示さず）。

本発明者らは、これらの大きい精製されたアルファサテライト整列を利用して、図4に概説し、実験手法に記載されたストラテジーを用いて合成染色体を生成させた。これらの染色体成分の各々を同時トランスフェクトすることによって、本発明者らは、細胞はこれらの要素を組み合わせて機能的染色体を形成するであろうと理由付けた。従って、HT1080細胞を、アルファサテライトDNA、テロメアDNA、およびヒトゲノムDNAの種々の組合せでトランスフェクトした。トランスフェクションに続き、培養を10-14日間G418選択下においた。次いで、個々のクローンを単離し、選択下で増殖させ、FISH分析のために収穫した。

#### 安定なトランスフェクタントの特徴

表1に示すように、トランスフェクションの大部分からのクローンにおいて、アルファサテライトDNAを内因性染色体に取り入れた。テロメアDNAを誘導した多くのトランスフェクションにおいて、染色体切形と関連したアルファサテライト取り込み事象の高発生も観察された。テロメアDNAを用いて取り込みに続いてヒト染色体を効果的に切形できることが従来に観察されている（Barnett, M. A. ら, *Nucleic Acids Res.* 21:27-36(1993); Brown, K. E. ら, *Hum. Mol. Genet.* 3:1227-37(1994); Farr, C. J. ら, *EMBO J.* 14:5444-54(1995)）。ここに、テロメアDNAは、アルファサテライトDNAと共に内因性染色体に明らかに取り込まれ、切形事象を引き起こす。

しかしながら、トランスフェクションのサブセットからの細胞において、トランスフェクトされたアルファサテライトDNAを含有する合成染色体が観察された（表2、トランスフェクション22および23および図5-7）。これらの陽性トランスフェクションは2つの点で他のトランスフェクションと異なった。まず、トラ

ンスフェクションに先立って、アルファサテライトDNAを、BamHIおよびBglIIの存在下でインビトロで予め連結させた（図3Aおよび3B）。この結果、長さが100kb～736kbの範囲の大きな方向性アルファサテライト整列が得られた。第2に、N

otI消化のヒトゲノムDNAがトランスフェクションに含まれた。これらの2つの成分を含ませることによって、合成染色体形成に必要な必須DNA配列が提供された。

トランスフェクション22および23からのクローンのFISH分析は、G418耐性クローンのほぼ50%が合成染色体を含有することを明らかにした（表1）。これらの2つのトランスフェクションからのクローンを含有する5つの合成染色体のうちの4つにおいて、トランスフェクトされたアルファサテライトDNAは合成染色体でのみ検出できた（図4-6）。すなわち、トランスフェクトされたYアルファサテライトDNAの場合には、合成染色体およびY染色体のみが、FISHによって検出可能なシグナルを有した。同様に、トランスフェクトされた17アルファサテライトDNAの場合には、合成染色体および第17染色体のみがFISHによって検出可能な17 $\alpha$ シグナルを有した。興味深いことに、合成染色体はトランスフェクション22および23双方において形成した。これは、Y染色体および第17染色体からのアルファサテライトが、共に、合成染色体の形成を容易にし得ることを示す。アルファサテライトDNAが合成染色体の重要な成分であるというさらなる証拠として、アルファサテライトFISHシグナルは各合成染色体のほとんどまたは全部を含む。

合成染色体を含有する細胞において、（トランスフェクションで使用する合成 $\alpha$ サテライトDNAとして同一染色体に由来する）アルファサテライトDNAは合成染色体およびY染色体（または17 $\alpha$ サテライトがトランスフェクトされる場合には第17染色体）以外の染色体で検出されたという2つだけの例外がある。まず、クローン17-15において、17アルファサテライトDNAは合成染色体、第17染色体、およびC群染色体の端部で検出された（図7AおよびB）。興味深いことには、このトランスフェクションは、未連結アルファサテライトおよびテロメアDNAを含有したが、ヒトゲノムDNAは含有しなかった。1つの可能性は、内因性染色体に組み入れられたトランスフェクトされたDNAが増幅され、破壊され戻ったという



ことである。もし非アルフォイド、非テロメアヒト配列が染色体機能に必要であれば、合成染色体形成のこのメカニズムは、トランスフェクションにおいてヒトゲノムDNAの不存在下でさらなるDNAエレメントを供する必要があることに注意することは重要である。同時トランスフェクトされたヒトゲノムDNAの不存在下で合成染色体が形成される1つの場合において、アルファサテライトが内因性染色

体に取り込まれることもまた判明した。これは、ゲノムDNAが合成染色体形成または維持のいくつかの態様に必要であることを示す。第2に、クローン22-11において、合成染色体およびY:14染色体転位が共に観察された(図7CおよびD)。パルスフィールドゲル電気泳動によって、本発明者らは、Y:14転位が内因性YアルファサテライトDNAを含有するが、合成YアルファサテライトDNAを含有しないことを示した。かくして、合成アルファサテライトDNAはミクロ染色体で検出可能にすぎず、いずれの内因性染色体においても検出できない。

#### 合成染色体部位の見積もり

合成染色体を含有する細胞に存在するアルファサテライトDNAの量は約350kb~2mbの範囲である(図8)。これは、合成および内因性アルファサテライト整列の間の制限部位多形を利用することによって測定された。サザンブロット上で合成アルファサテライトバンドの強度を内因性アルファサテライトバンドに対して比較することによって、内因性アルファサテライトDNAに対する合成アルファサテライトDNAの比率を測定し得る。内因性アルファサテライト整列は長さが1mbであるので(Larinら, Hum. Mol. Genet. 3:689-95(1994))、かつY染色体のコピー数(クローン22-6、22-7、および22-11につき2およびクローン22-13につき1)および合成染色体のコピー数は知れているので(表2)、合成アルファサテライトDNAのキロベースでの量(図7B)を見積もることができる。

これらの合成染色体の総じてのサイズを見積もるのは困難であるが、ある場合には、合成染色体は1000×倍拡大の蛍光顕微鏡を用いてわずかに検出し得る。

#### 合成染色体の構造とコピー数

最初の分析では、合成染色体含有細胞の各クローンは極めてわずかな合成染色体しか持たず、ほとんどの場合、1細胞あたり1つだけだった。このことは、合成

染色体のコピー数が内因性染色体と同様に調節されていることを示す。

コピー数の他にも、合成染色体はさらに2つの特徴を内因性染色体と共有している。第1に、それらはテロメア配列を含有する（データの開示なし）。このことは、これらの合成染色体が直鎖状であることを示唆している。第2に、中期染

色体では、個々の染色分体が各合成染色体上にはっきりと見える（図6～7）。このことは、合成染色体の全体構造が、内因性染色体と類似していることを示す。さらに、染色分体は通常、セントロメアで結合しているのもので、この結果は、合成染色体が少なくとも1つのセントロメア機能（姉妹染色分体の結合）を遂行しうることをも示している。

CENP-Eは中期の合成染色体と結合する

合成染色体（ほとんどの場合、単一コピー）が分裂細胞中に存在することは、機能的セントロメアの生成を示す。このことをさらに調べるため、いくつかの合成染色体を調べて、CENP-Eが中期のセントロメアに存在するかどうかを決定した。CENP-Bが機能的セントロメアと非機能的セントロメアの両方に存在することは既に示されている（Earnshaw, W.C. ら, *Chromosoma* 98 : 1-12 (1989)）。したがって、これをセントロメア活性のマーカーとして使用することはできない。そのため、一般にCENP-Bを極めて強く認識するCREST抗血清（過去の実験で使用されたもの：Haafら、Larinら、およびPraznovskyら（前出））は、セントロメア活性を評価するにはよい試薬とはいえない。これに対し、CENP-Eは、機能的セントロメアにのみ存在することが示されている（SullivanおよびSchwartz, *Hum. Mol. Genet* 4:2189-2197 (1995)）。したがって、このタンパク質に対するモノ特異的抗体を、セントロメア活性の評価に使用することができる。

機能的セントロメアの存在と合致して、CENP-Eがクローン22-11と23-1（現在までに試験した唯一のクローン）中の合成染色体上に存在することがわかった（図9）。さらに、合成染色体上のCENP-Eの量は、各内因性染色体のセントロメアに存在する量と類似している。これは興味深い事実である。というのは、CENP-EはセントロメアDNAに直接結合するとは考えられていないので、そのレベルはアルファサテライトの存在量には依存しないからである。むしろ、これは機能的キ

ネトコアが生成しているかどうかによりのみ依存する。したがって、中期の合成染色体上にCENP-Eが存在することは、それらがセントロメア/キネトコア複合体の形成を指示できる機能的セントロメアを含有することを強く示唆している。

合成染色体は選択の不在下に有糸分裂的に安定である

合成染色体が機能的セントロメアを含有し、分裂細胞中で正しく分離できることを確認するために、合成染色体含有細胞を選択の不在下に所定の期間、増殖させた。次に、それらの細胞をFISHで分析することにより、合成染色体を含む細胞の割合を決定した。選択の不在下に46日（約60細胞世代）後、合成染色体はまだ大半の細胞に存在していた（表2）。いくつかのクローンでは、合成染色体がまだ100%の細胞に存在していた。このことは、合成染色体が有糸分裂的に安定であることを示すので、これらのベクターを用いて分裂細胞をトランスフェクトすることにより、遺伝子欠損をインビボで補正できるという考えは妥当である。

各合成染色体の分離効率を決定することに加えて、この実験により、我々は、合成染色体の経時的な構造上の安定性を評価することもできた。各クローンについて50染色体スプレッド（spread）を走査したが、合成染色体が内因性染色体に組み込んでいるケースは観測されなかった。また、合成染色体が関与するその他の大きな再編成も観測されなかった。この結果は、有糸分裂安定性が高いことと共に、これらの合成染色体が内因性ヒト染色体と同じ特徴を数多く持つ独立した遺伝子単位として振る舞うことを立証している。

合成染色体からの遺伝子発現

本明細書に記述する合成染色体は、体細胞遺伝子療法用の代替ベクターを提供する。したがって、異種遺伝子がこれらの染色体ベクターから効率よく発現されるかどうかを決定することが重要である。

実験手順に記述するように、pVJ104-Y $\alpha$ 16またはpVJ104-17 $\alpha$ 32をテロメアDNAおよびヒトゲノムDNAと同時にHT1080細胞にトランスフェクトすることにより、合成染色体を作出した。各トランスフェクションでは、 $\beta$ -geo発現単位を少なくとも100kbのアルファサテライトDNAに連結した。トランスフェクション後、細胞内のアルファサテライトの位置は、 $\beta$ -geo遺伝子の位置と同じである。したがって

、合成染色体クローンでは、クローン17-15を除いて、 $\beta$ -geo遺伝子をもつばら合成染色体上に位置する。

各合成染色体含有クローンにおける $\beta$ -geo発現のレベル（したがって合成染色

体からの遺伝子発現の程度）を測定するために、実験手順に記述するX-gal平板染色法を用いて、細胞をアッセイした。この技術は比較的感度が低い（すなわち $\beta$ -geo発現が高くなければ検出されない）が、発現レベルとこのマーカー遺伝子を発現させる細胞の割合のおおまかな近似値を与えた。G418選択なしで70日（約80細胞分裂）間の培養後、クローン22-11で、少なくとも50%の細胞%が、このアッセイで検出できるレベルの $\beta$ -geoを発現させた（図10）。クローン22-6では、細胞の約25%が、選択なしで70日後に、検出可能な $\beta$ -geo活性を持っていた（データの開示なし）。他のクローンにおける発現は、このアッセイの感度が低く、かつそれらの細胞における $\beta$ -geo発現が低いために、評価することができなかった。

#### 考察

これらの結果は、裸のDNAを哺乳類細胞にトランスフェクトすることができ、それらが、内因性染色体に組み込むことなく、機能的な合成染色体を形成しうることを示している。これらの合成染色体は、正常な哺乳類染色体の特徴を数多く持つ。第1に、それらは低コピー数（通常は1細胞あたり1コピー）で細胞中に存在する。第2に、合成染色体は直鎖状で、テロメア配列を含有するようである。第3に、有糸分裂の間はCENP-Eが合成染色体に結合しており、このことは、機能的キネトコアの形成を示す。第4に、これらの合成染色体は選択の不在下に有糸分裂的に安定である。第5に、これらの合成染色体は転写的に活性な遺伝子を保持することができる。最後に、これらの合成染色体の構造は経時的に安定で、検出可能な組込み頻度を持たない。正常なヒト染色体とは異なり、合成染色体は小さく、容易に操作できるので、種々の染色体状況で異なる遺伝子を発現させることを可能にする。

これらの結果は、736kb長までのアルファサテライト配列（整列）を作成するためのインビトロ法を示す。これらの効果は、本明細書に記載の合成染色体に必

須成分を提供することに加えて、アルファサテライトが臨床的に有用な量で生産されうることを立証している。過去には、200kbより大きい構造的に無傷なアルファサテライトDNAを、哺乳類細胞のトランスフェクションに必要な量で精製で

きる方法はなかった。

対照実験として、本発明者らは、不成功に終わったHaafらの過去の実験を再現して、 $\alpha$ サテライトDNAの内因性染色体への同時組み込みを伴う染色体を作成した。これが起こったトランスフェクションは、追加のゲノムDNA配列を欠いた。ゲノム配列が無いことから、この染色体は、組み込まれたアルファサテライトDNAを含有する内因性染色体の1つから、切断事象の結果として生成した可能性が極めて高い。効率が悪く頻度が低いことに加えて、染色体切断機構の結果としてゲノム再編成と宿主細胞の悪性形質転換を誘導する危険があるため、このアプローチは遺伝子治療には有用でない。

要約すると、本発明者らは、大きなアルファサテライト配列、テロメアDNAおよびゲノムDNAと一緒にヒト細胞にトランスフェクトすることにより、有糸分裂的に安定な合成染色体を作出できることを立証した。これらの成分のそれぞれは、効率のよい合成染色体形成には必要であると思われるが、アルファサテライトDNAの組み込み後のゲノム再編成が、ゲノム（非アルファサテライト、非テロメア）配列の不在下に、染色体形成を引き起こし得る可能性はある。これに対し、アルファサテライトDNAは、これらの合成染色体を生産するために絶対に必要だと思われる。ここで、本発明者らは、Y染色体と第17染色体に由来するアルファサテライトを用いて合成染色体を作成することにより、アルファサテライトDNAの起源が重要でないことを立証した。言い換えれば、任意の染色体から得たアルファサテライトDNAを使用して、合成染色体を作成することができる。また、ヒト染色体が、マウス、ハムスターおよび霊長類を含む種々のハイブリッド中で安定だとすれば、これら他の種に由来するアルファサテライト様配列を使用して、本明細書に記述するような合成染色体を作成することもできる。

表 1

クローン	Yα	17α	hg	tel	VK75	特徴
C10-7	XX			X		組み込み体 (大染色体の中α)
C10-10	XX			X		組み込み体 (中α-中サイズの染色体)
C11-7		X		X		組み込み(17p+を形成する)
C11-19		X		X		シグナルなし
C12-2		XX		X		シグナルなし
C12-3		XX		X		シグナルなし
C12-5		XX		X		組み込み(中α-)
C12-6		XX		X		組み込み(非テロメア)
C12-14		XX		X		シグナルなし
C12-16		XX		X		シグナルなし
C13-1				X	X	組み込み
C14-1	X			X	X	テロメア指向切り
C15-2	X			X		第6染色体切り; 新たなテロメア
C15-3	X			X		シグナルなし
C15-4	X			X		組み込み(第16染色体 のpアーム)
C15-5	X			X		シグナルなし
C15-10	X			X		末端動原体染色体に 組み込み
C15-12	X			X		セントロメア下の第17 染色体に組み込み
C15-13	X			X		シグナルなし
C15-21	X			X		シグナルなし
C16-6	XX			X		テロメア/末端動原体p - 収縮
C16-7	XX			X		シグナルなし
C17-2		X		X		シグナルなし
C17-8		X		X		シグナルなし

クローン	Y $\alpha$	17 $\alpha$	hg	tel	VK75	特徴
C17-11		X		X		C群染色体の切り
C17-15		X		X		ミクロ染色体, C群染色体の切り
C17-19		X		X		シグナルなし
C19-1	X		X	X		シグナルなし
C19-2	X		X	X		はきりしない (テロメア指向切り?)
C21-1			X	X	X	シグナルなし
C22-2	(XX)		X	X		染色体切り (糸状体テロメア @ 19p)
C22-3	(XX)		X	X		シグナルなし
C22-4	(XX)		X	X		テロメア/おそらく=動原体
C22-5	(XX)		X	X		はきりしない; 非常に小さなミクロ?
C22-6	(XX)		X	X		二重ミクロ (多重ミクロ)
C22-7	(XX)		X	X		大きなミクロ
C22-8	(XX)		X	X		はきりしない (おそらくミクロ)
C22-9	(XX)		X	X		テロメア / 大きな整列
C22-11	(XX)		X	X		小さなミクロ
C22-13	(XX)		X	X		大きなミクロ
C23-1		(XX)	X	X		小さなミクロ

表1 様々な組み合わせのアルファサテライトDNA、テロメアDNAおよびヒトゲノムDNAをヒト細胞にトランスフェクトした結果。Y $\alpha$ と17 $\alpha$ は、それぞれY染色体および第17染色体由来のアルファサテライトの略号である。hgは、Not Iで消化したヒトゲノムDNAの略号である。TelはテロメアDNAの略号である。VK75はX染色体由来の75kbフラグメントの略号である。Xは、配列がそのトランスフェクションに含まれたことを示す。XXは、実験手順に記述したように、追加の精製アルファサテライトDNAをそのトランスフェクションに含めたことを示す。(XX)は、実験手順に記述したように、追加のアルファサテライトDNAを、トランスフェクションに先立って、b-geo/アルファサテライト構築物に予め連結したことを示す。

表 2

クローン	t=0 日	t=10 日	t=20 日	t=46 日
22-7 (Y)	10細胞: 2 Y	10細胞: 2 Y (7細胞)	10細胞: 2 Y (9細胞)	10細胞: 2 Y (8細胞)
ミクロ染色1本	1 ミクロ染色1本 :	1 ミクロ染色1本 :	1 ミクロ染色1本 :	1 ミクロ染色1本 :
	100%	100%	100%	100%
22-11 (Y)	20細胞: 2 Y (17細胞)	10細胞: 2 Y (6細胞)	10細胞: 2 Y (8細胞)	10細胞: 2 Y (5細胞)
ミクロ染色1本	1(Y;14) (19細胞)	1(Y;14) (9細胞)	1(Y;14) (10細胞)	1 Y (4細胞)
	0 ミクロ染色1本 (7細胞)	13 p+ (8-9細胞)	13 p+ (8+細胞)	0 Y (1細胞)
	1 ミクロ染色1本 (12細胞)	1 ミクロ染色1本 (2細胞)	0 ミクロ染色1本 * (2細胞)	0 ミクロ染色1本 (5細胞)
	2 ミクロ染色1本 (11細胞)	2 ミクロ染色1本 (8細胞)	1 ミクロ染色1本 (2細胞)	1 ミクロ染色1本 (2-3細胞)
	65%	100%	2 ミクロ染色1本 (5細胞)	2 ミクロ染色1本 (2細胞)
			3 ミクロ染色1本 (1細胞)	40-50%
			780+%	
22-13 (Y)	17細胞: 1 Y	10細胞: 1 Y	10細胞: 1 Y	10細胞: 1 Y
ミクロ染色1本	1 ミクロ染色1本 :	1 ミクロ染色1本 :	1 ミクロ染色1本 :	1 ミクロ染色1本 :
	100%	100%	100%	100%



クローン	t=0 日	t=10 日	t=20 日	t=46 日
23-1 (17)	11細胞: 4-17	10細胞: 4-17	10細胞: 4-17	10細胞: 4-17
ミクロ染色体	1ミクロ染色体:	1ミクロ染色体:	1ミクロ染色体:	1ミクロ染色体:
	100%	100%	100%	100%
17-15 (17)	17細胞: 4-17 (15細胞)	未測定	10細胞: 4-17	未測定
ミクロ染色体	1Cqter (10細胞)		1Cqter (6細胞)	
	1ミクロ染色体:		1ミクロ染色体:	
	100%		100%	
22-6 (Y)	9細胞: 2 Y	10細胞: 2 Y	10細胞: 2 Y (7細胞)	未測定
系祖細胞シグナル	1培養細胞系祖細胞, 12細胞	1培養細胞系祖細胞, 12細胞	1培養細胞系祖細胞, 12細胞	
	1 D 様 w/シグナル (2細胞)	1 D 様 w/シグナル (1細胞)	1 E 様 (1) w/シグナル (1細胞)	
* 両方のスプレッドが示された				

表2 合成染色体は選択の不在下に有糸分裂的に安定である。各クローンを、選択の不在下に表記の日数、増殖した。この培養期間の後、FISHのために細胞を収集し、本明細書の実験手順に記述するように、適切なアルファサテライトプロブにハイブリダイズした。各時点について、分析した細胞の数、Y染色体の数（またはクローン23-1と17-15の場合は第17染色体の数）および合成染色体の数を記載する。さらに、合成染色体を含有する細胞の割合を、各時点について太字で示す。0、10および20日の時点は、それぞれ0、12および24細胞分裂に対応する。

上の記述は特定の好ましい態様に関するものであるが、本発明がそれらに限定

されないことは理解されるだろう。当業者は開示した態様に種々の修飾を施すことができ、それらの修飾も本発明の範囲に含まれることが理解される。

#### 配列表

##### (I) 一般的情報：

###### (i) 出願人：

- (A) バン ボックレン, ギル ビー.
- (B) ハーリントン, ジョン ジェイ.
- (C) ウィラード, ハンティントン エフ.

###### (ii) 発明の名称：合成哺乳動物染色体および構築のための方法

###### (iii) 配列数：5

###### (iv) 連絡住所：

- (A) 名称：スターン, ケスラー, ゴールドステイン アンド フォックス  
ピー. エル. エル. シー.
- (B) 番地：1100 ニューヨーク アベニュー, エヌ. ダブリュー.,  
スイート600
- (C) 市：ワシントン
- (D) 州：デュー. シー.
- (E) 国：アメリカ合衆国
- (F) 郵便番号：20005-3934

###### (v) コンピューター読み出し形態：

- (A) 媒体型：フロッピー ディスク
- (B) コンピューター：IBM PC 互換用
- (C) OS：PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフトウェア：パテントイン リリース ナンバー1.0,  
バージョン ナンバー1.30 (EPO)

###### (vi) 現在の出願データ：

- (A) 出願番号：(追って補充)
- (B) 出願日：1996年6月7日

###### (vii) 先願データ：

- (A) 出願番号：US 08/487,989 および US 08/643,554
- (B) 出願日：1995年6月7日 および 1996年5月6日

###### (viii) 代理人/事務所情報：

- (A) 氏名：ミシェル エイ. シンバラ
- (B) 登録番号：33,851
- (C) 照会/記録番号：1522.0001PC02

(2) 配列番号 1 の情報 :

(i) 配列の特色 :

- (A) 長さ : 17 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 両形態
- (D) トポロジー : 両形態

(ii) 配列の種類 : cDNA

(xi) 配列 : 配列番号 1 :

ATTTCGTTGGA AACGGGA  
17

(2) 配列番号 2 の情報 :

(i) 配列の特色 :

- (A) 長さ : 41 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 両形態
- (D) トポロジー : 両形態

(ii) 配列の種類 : cDNA

(xi) 配列 : 配列番号 2 :

GGGCGGGAGA TCTCAGAAAA TTCTTTGGGA TGATTGAGTT G  
41

(2) 配列番号 3 の情報 :

(i) 配列の特色 :

- (A) 長さ : 41 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 両形態
- (D) トポロジー : 両形態

(ii) 配列の種類 : cDNA

(xi) 配列 : 配列番号 3 :

GGGCGGGATC CCTTCTGTCT TCTTTTATA GGAAGTTATT T  
41

(2) 配列番号 4 の情報 :

(i) 配列の特色 :

- (A) 長さ : 39 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 両形態
- (D) トポロジー : 両形態

(ii) 配列の種類 : cDNA

(xi) 配列 : 配列番号 4 :

GGGTTAGGGT TAGGGTTAGG GTTAGGGTTA GGGTTAGGG  
39

(2) 配列番号 5 の情報 :

(i) 配列の特色 :

- (A) 長さ : 39 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 両形態
- (D) トポロジー : 両形態

(ii) 配列の種類 : cDNA

(xi) 配列 : 配列番号 5 :

CCCTAACCCT AACCCTAACC CTAACCCCTAA CCCTAACCC  
39

【図1】

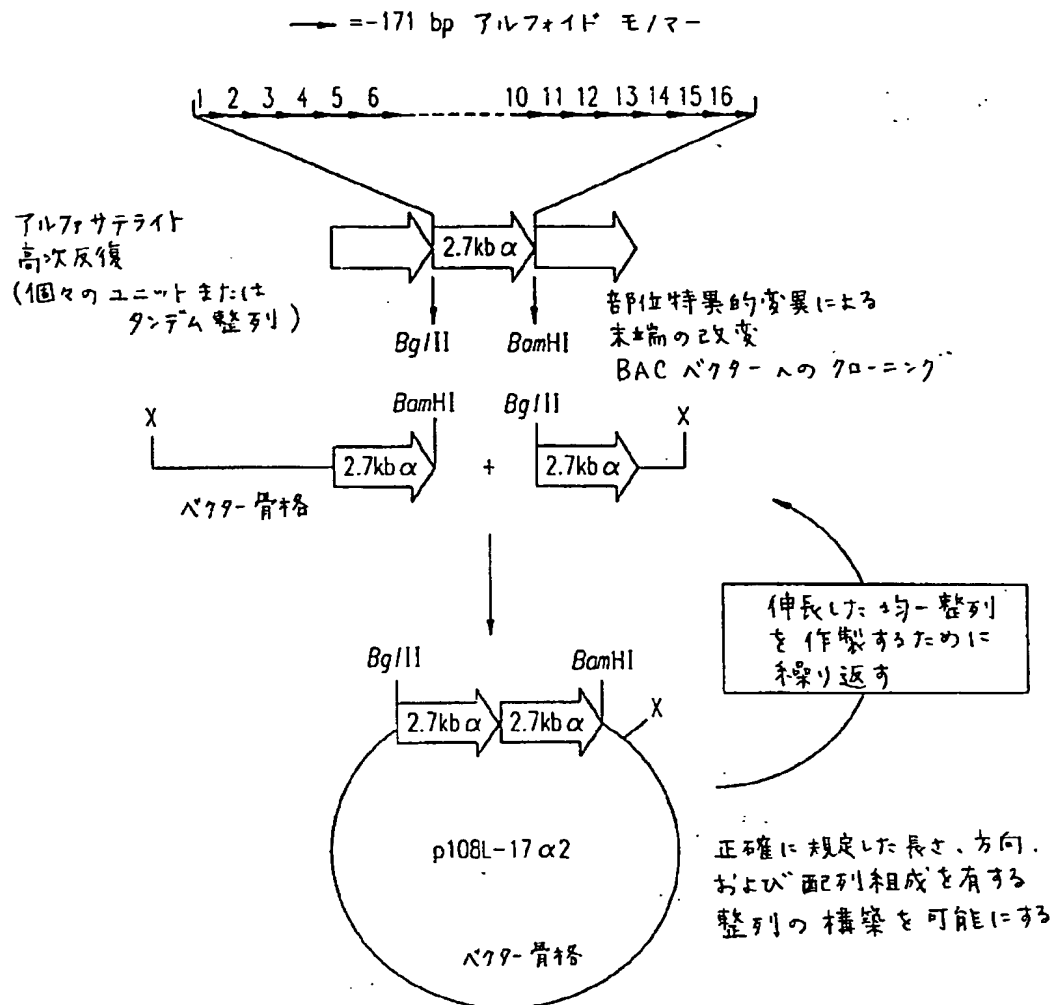


FIG.1

【図2】

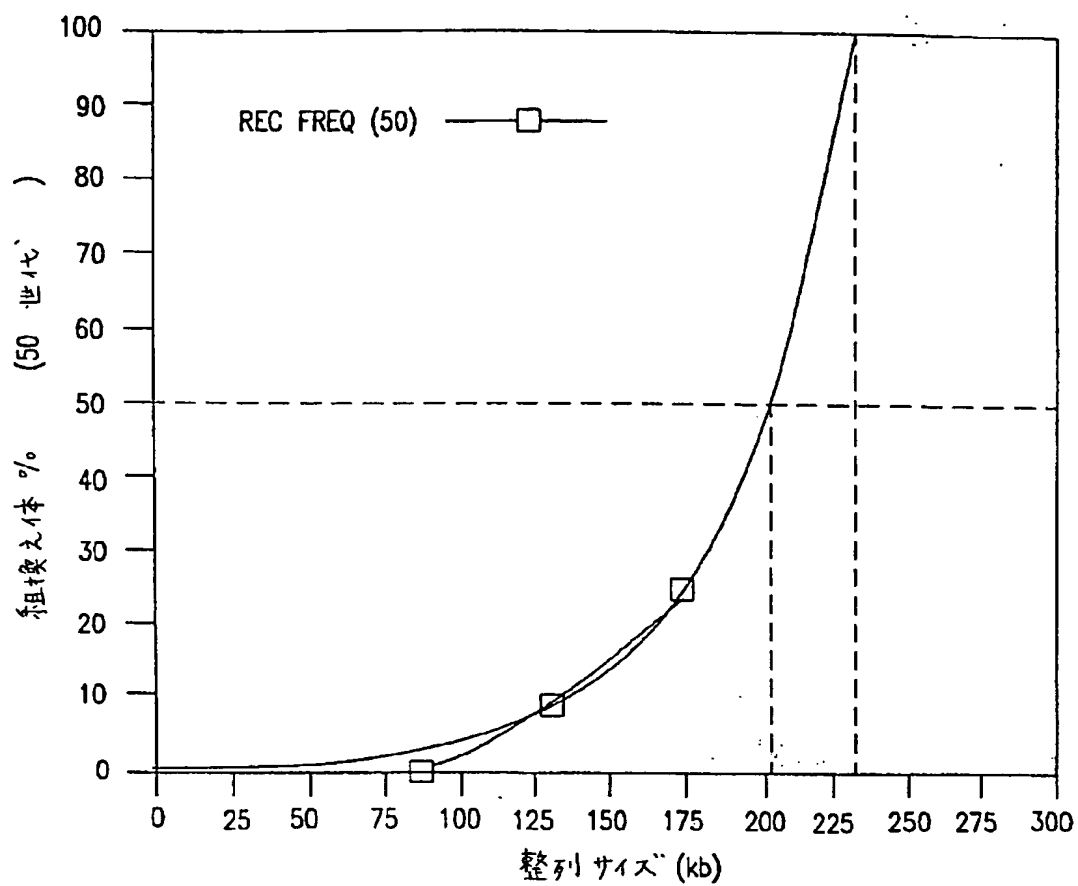


FIG.2

【図3】

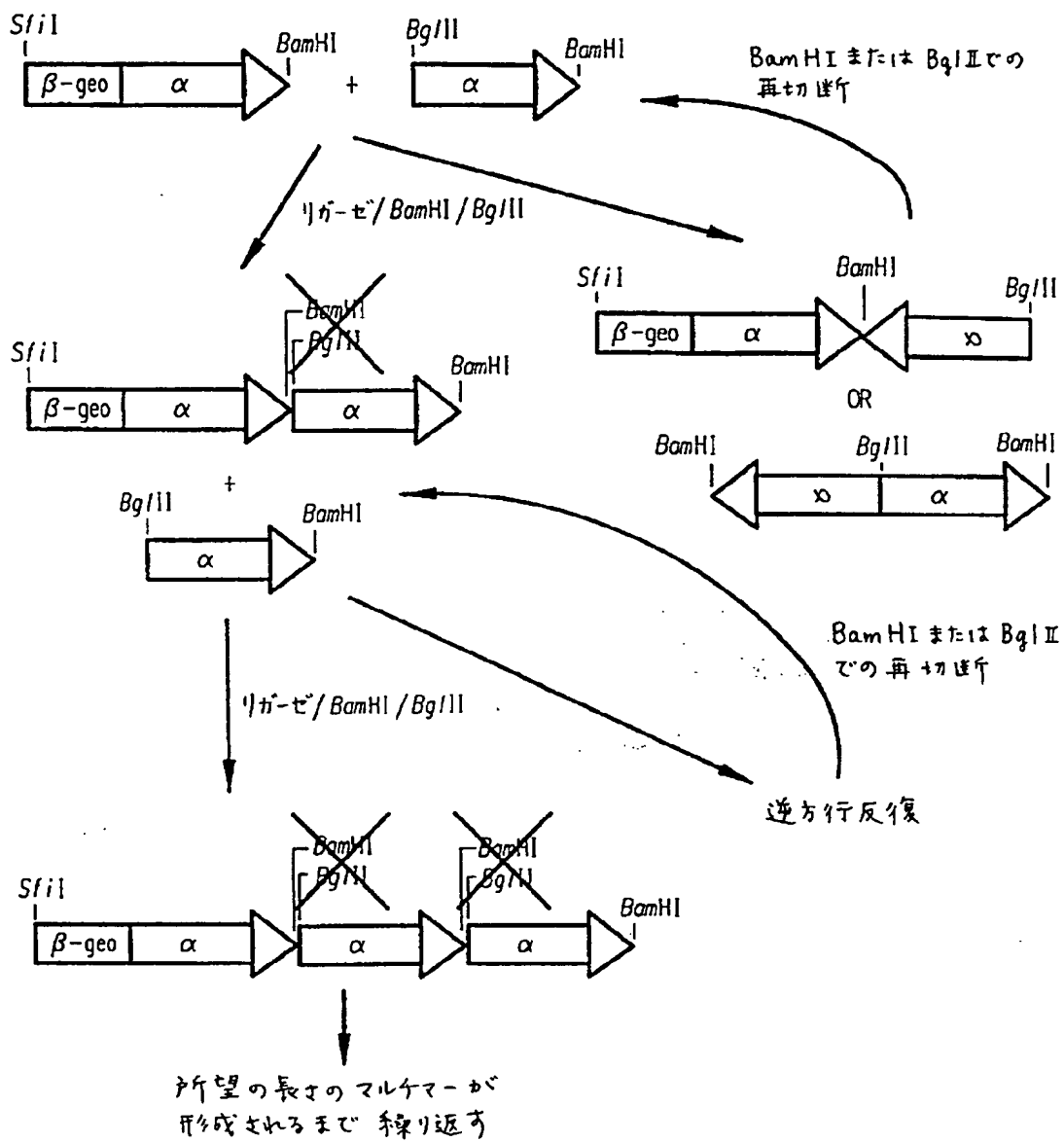


FIG.3A

【図3】



FIG.3B



【図4】

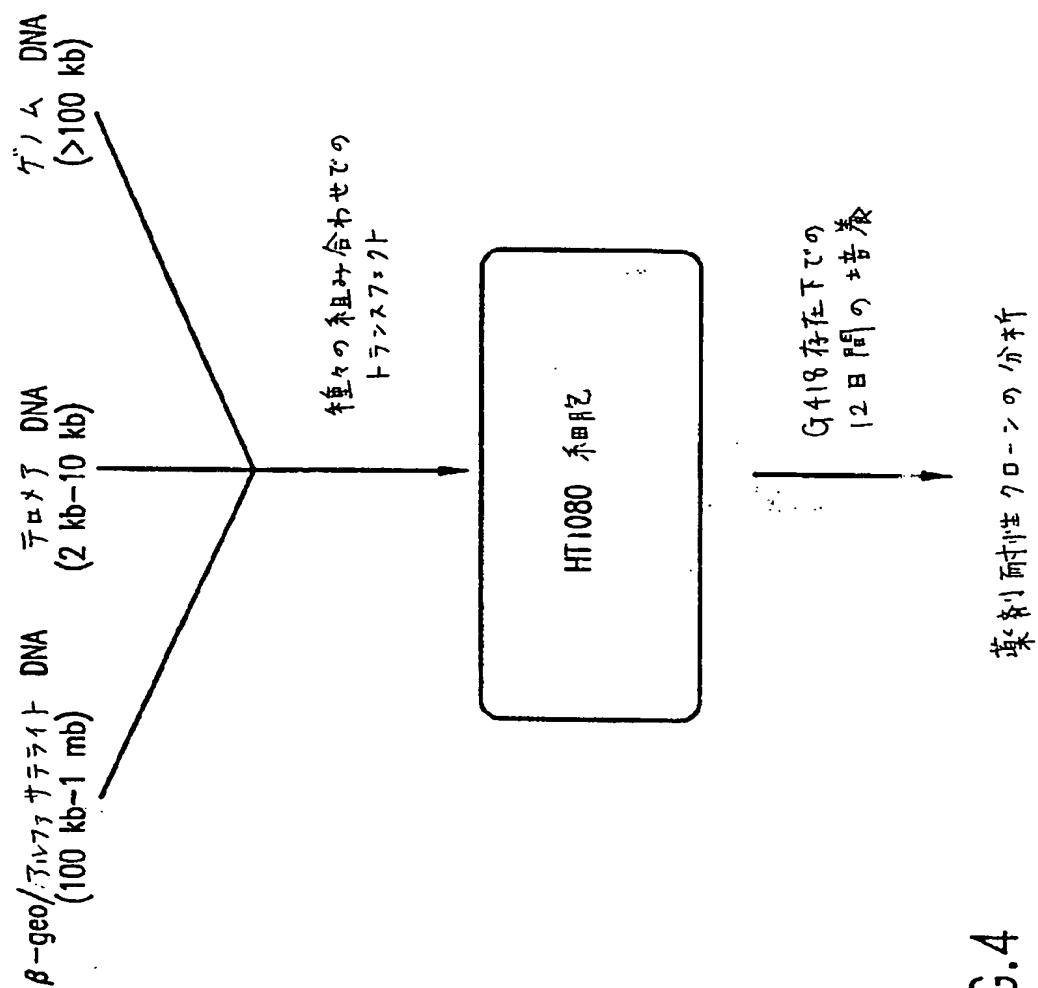


FIG.4

【図5】

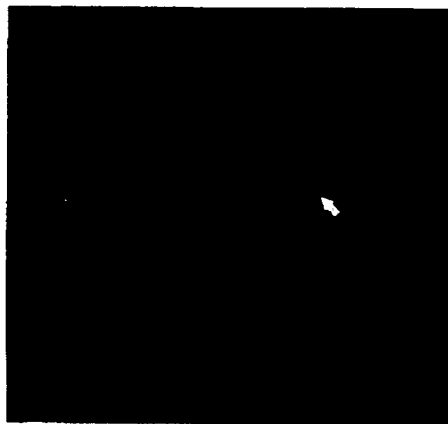


FIG. 5A



FIG. 5B

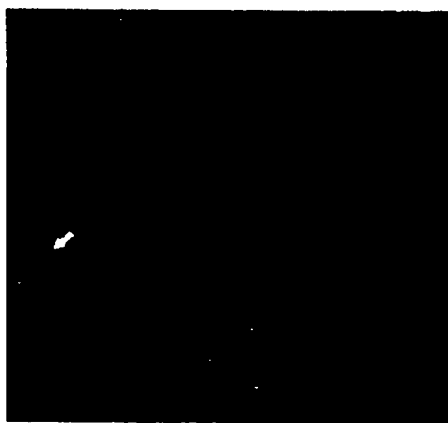


FIG. 5C



FIG. 5D

【図 6】



FIG.6A

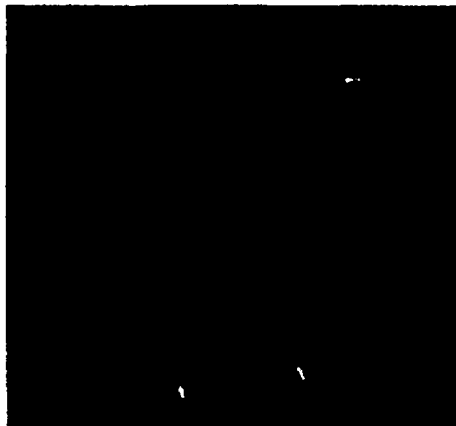


FIG.6B

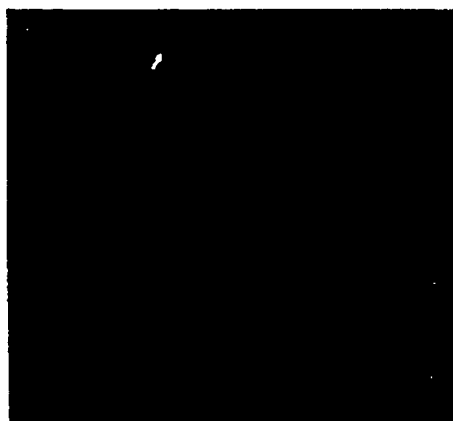


FIG.6C

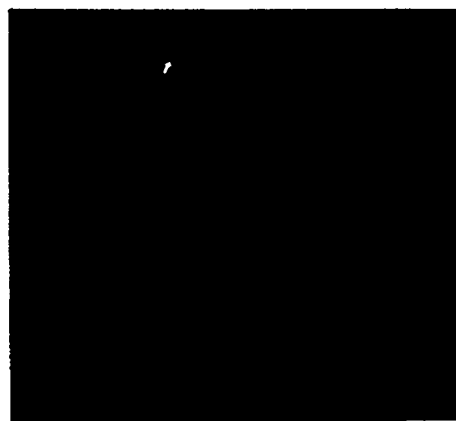


FIG.6D

【図 7】

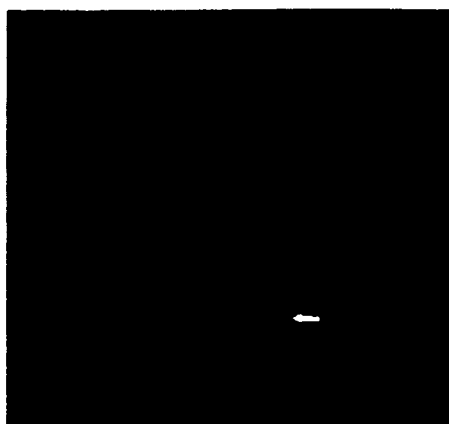


FIG. 7A

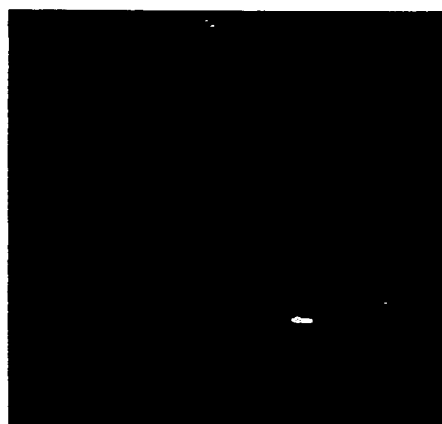


FIG. 7B

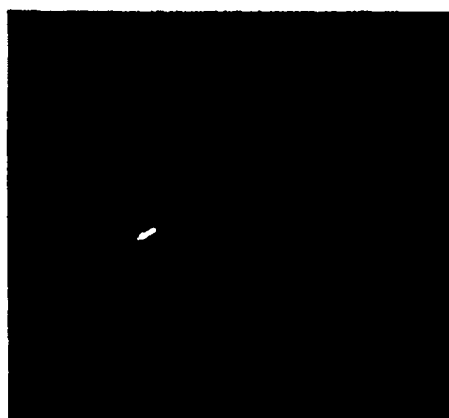


FIG. 7C

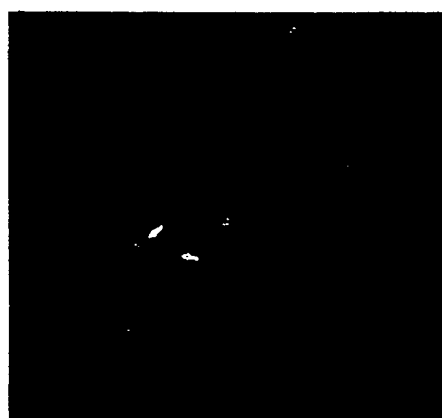


FIG. 7D

【図8】



FIG.8A

【図8】

クローン	トランスフェクションDNA	合成アルファサテライト DNAの推定量
HT1080	Ø	Ø
22-6	合成 Y アルファサテライト	450 kb
22-7	合成 Y アルファサテライト	1 mb
22-11	合成 Y アルファサテライト	400 kb
22-13	合成 Y アルファサテライト	2 mb
23-1	合成 17 アルファサテライト	Ø

FIG.8B

【図9】



FIG. 9A

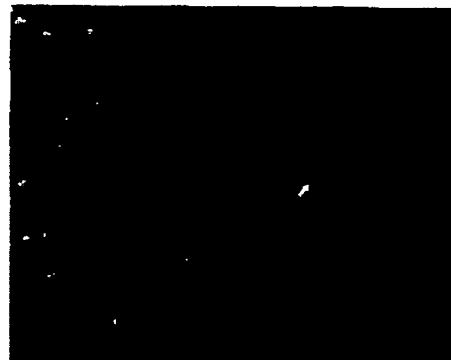


FIG. 9B

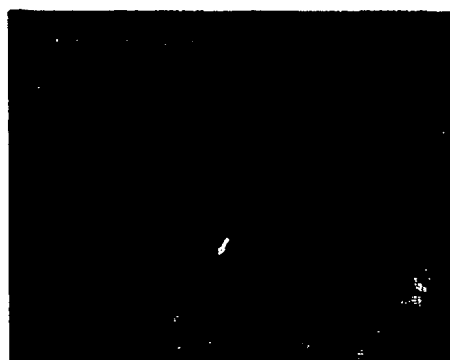


FIG. 9C



FIG. 9D

【図10】



FIG.10B



FIG.10A



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

<p>International Application No. PC 1, US 96/10248</p>		
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/90 C12N15/85 C12N15/12 C12N15/62</p>		
<p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
<p>B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N</p>		
<p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p>		
<p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)</p>		
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP, A, 0 532 050 (BIOLOG RESEARCH CENTER OF THE) 17 March 1993 cited in the application see page 3, line 56 - page 4, line 1; examples 2,3	1,2,18, 35-37, 40-42
X	WO, A, 92 07080 (UNIV TEXAS) 30 April 1992  see claims 1,2,8,35	1,2,18, 26, 35-37, 40-42
X	HUMAN MOLECULAR GENETICS, 3 (8). 1994. 1383-1386.. XP000601479 TAYLOR S S ET AL: "Addition of functional human telomeres to YACs" see the whole document	1,2,18, 26, 35-37, 40-42
-/--		
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.</p>		<p><input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.</p>
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
<p>Date of the actual completion of the international search</p> <p>25 September 1996</p>		<p>Date of mailing of the international search report</p> <p>14. 10. 96</p>
<p>Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentkanal 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 cpo nl, Fax (+31-70) 340-3016</p>		<p>Authorized officer</p> <p>Gurdjian, D</p>

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC:US 96/10248

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>GENE THER, JAN 1994, 1 (1) P7-12, ENGLAND, XP000600458</p> <p>HUXLEY C: "Mammalian artificial chromosomes: a new tool for gene therapy." see the whole document</p> <p>---</p>	<p>1-42, 56-68</p>
Y	<p>PROC NATL ACAD SCI U S A, AUG 15 1991, 88 (16) P7006-10, UNITED STATES, XP002014229</p> <p>FARR C ET AL: "Functional reintroduction of human telomeres into mammalian cells." see the whole document</p> <p>---</p>	<p>1-42, 56-68</p>
Y	<p>PROC NATL ACAD SCI U S A, 88 (18). 1991. 8106-8110., XP002014230</p> <p>HADLACZKY G ET AL: "CENTROMERE FORMATION IN MOUSE CELLS COTRANSFORMED WITH HUMAN DNA AND A DOMINANT MARKER GENE" see the whole document</p> <p>---</p>	<p>1-42, 56-68</p>
Y	<p>NUCLEIC ACIDS RES, OCT 11 1995, 23 (19) P3999-4000, ENGLAND, XP002014231</p> <p>KOVACIC RT ET AL: "Protection of megabase DNA from shearing." see the whole document</p> <p>---</p>	<p>8,9,22, 23,30, 31,62,63</p>
A	<p>TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, 1994, 12, 280-286, XP000601472</p> <p>MONACO AP ET AL: "YACS, BACS, PACS AND MACS - ARTIFICIAL CHROMOSOMES AS RESEARCH TOOLS"</p> <p>see the whole document</p> <p>---</p>	<p>1-3,18, 19,26, 27, 35-37, 39-42, 56-59, 66,67</p>
A	<p>CURR. OPIN. GENET. DEV. (1992), 2(3), 479-86 CODEN: COGDET, XP000600761</p> <p>BROWN, WILLIAM R. A.: "Mammalian artificial chromosomes"</p> <p>see the whole document</p> <p>---</p>	<p>1-3,18, 19,26, 27, 35-37, 39-42, 56-59, 66,67</p>
A	<p>BIOTECHNOLOGY (N Y), JUN 1994, 12 (6) P586-90, UNITED STATES, XP002014232</p> <p>HUXLEY C ET AL: "Ordering up big MACs." see the whole document</p> <p>---</p>	<p>1-3,18, 19,26, 27, 35-37, 39-42, 56-59, 66,67</p>

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC1,JS 96/10248

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevant to claim No.
A	FR,A,2 593 827 (INST NAT SANTE RECH MED) 7 August 1987  see claims 1-7	1-3,18, 19,26, 27, 35-37, 39-42, 56-59, 66,67
Y	GENOMICS, JUL 1992, 13 (3) P585-93, UNITED STATES, XP000600712 GE Y ET AL: "Sequence, higher order repeat structure, and long-range organization of alpha satellite DNA specific to human chromosome 8." see the whole document	15, 44-47, 49-55
X	WO,A,91 07496 (ALLIED SIGNAL INC) 30 May 1991	43,48
Y	see page 1; example 1	44-47, 49-55
P,X	WO,A,95 32297 (CANCER RES CAMPAIGN TECH ;BROWN WILLIAM (GB)) 30 November 1995  see claims 1-9	1,2,18, 35-37, 40-42
T	CURR. OPIN. GENET. DEV. (1996), 6(3), 281-288 CODEN: COGDET;ISSN: 0959-437X, XP000602304 BROWN, WILLIAM ET AL: "Mammalian artificial chromosomes" see the whole document	1-42, 56-67

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC1/JS 96/10248

Patent documents cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0532050	17-03-93	US-A- 5288625 CA-A- 2078189 JP-A- 7177881	22-02-94 14-03-93 18-07-95
WO-A-9207080	30-04-92	AU-A- 8904691	20-05-92
FR-A-2593827	07-08-87	EP-A- 0240373 JP-A- 62248491	07-10-87 29-10-87
WO-A-9107496	30-05-91	NONE	
WO-A-9532297	30-11-95	AU-A- 2534395	18-12-95

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

識別記号

F I

C 1 2 R 1:19)

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(72) 発明者 ハーリントン, ジョン ジェイ.

アメリカ合衆国 オハイオ 44094, ウィ  
ロウビーヒルズ, パー レーン ナンバー  
1108 2260

(72) 発明者 ウィラード, ハンティントン エフ.

アメリカ合衆国 オハイオ 44106, シェ  
イカーハイツ, シェイカー ブールバード  
22565